UNTERSUCHUNGEN ZUR INTERAKTION DES KOPPLUNGSFAKTORS DER PHOTOSYNTHETISCHEN PHOSPHORYLIERUNG MIT DER THYLAKOIDMEMBRAN DURCH IMMUNCHEMISCHE METHODEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

PETER ROOS

aus Bochum

Bochum 1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547222_0021

Untersuchungen zur Interaktion des Kopplungsfaktors der photosynthetischen Phosphorylierung mit der Thylakoidmembran durch immunchemische Methoden

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

PETER ROOS

aus Bochum

Bochum 1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Referent: Prof. Dr. R.J. Berzborn
Korreferent: Prof. Dr. W. Rüger

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung 1

II. Problemstellung 6

III. Ergebnisse 8

1. Quantitative Bestimmung von CF_1 durch Elektroimmunodiffusion (= Rocketimmunelektrophorese) 8

1.1. Rocketbildung mit isoliertem CF_1 9

1.2. Elektrophoresebedingungen 10

1.3. Behandlung von Thylakoidmembranen zur Bestimmung von membrangebundenem CF_1 10

1.4. Charakterisierung der ATPase aus tritongelösten Thylakoidmembranen 13

1.5. Einfluß verschiedener Substanzen auf die Rocketlänge 16

1.6. Statistische Bewertung der neuen Immunmethode zur CF_1-Bestimmung 17

1.7. Bestimmung des CF_1/Chlorophyll-Verhältnisses in Thylakoidmembranen durch Elektroimmunodiffusion 18

1.8. Diskussion der Methode 20

2. Untersuchung der CF_0-CF_1-Bindung und -Dissoziation mit Hilfe der Elektroimmunodiffusion 22

2.1. Abhängigkeit der CF_0-CF_1-Dissoziation vom pH-Wert bei der EDTA-Behandlung von Thylakoiden 22

2.2. pH-Abhängigkeit der CF_0-CF_1-Dissoziation nach M^{2+}-Komplexierung durch EDTA bei pH 6,0 bzw. 10 mM $Na_4P_2O_7$ 23

2.3. Einfluß verschiedener Metallionen auf die CF_0-CF_1-Dissoziation bei pH 7,2 nach M^{2+}-Komplexierung durch EDTA bei pH 6,0 25

2.4. Bindung von CF_1 an EDTA-behandelte Thylakoidmembranen 26

2.5. Diskussion der Ergebnisse aus Kapitel 2 29

3. Isolierung und Bestimmung von δ-freiem CF_1 und δ 33

3.1. Isolierung und Bestimmung von δ-freiem CF_1 34

3.2. Isolierung von δ aus Spinat-CF_1 37

1. Kombination der Methoden von NELSON & KARNY (129) und YOUNIS et al. (204) zur δ-Isolierung aus CF_1 37

2. Gelfiltration von pyridin-dissoziiertem CF_1 41

3.3. Herstellung und Charakterisierung von Antiseren gegen die δ-Untereinheit aus Spinat-CF_1 43

3.4. Bestimmung von freiem, CF_1-gebundenem und membrangebundenem δ durch Elektroimmunodiffusion 44

1. Abhängigkeit der δ-Rocketlänge von der Antigenmenge 45

2. Behandlung von Thylakoidmembranen zur Erzeugung von δ-Rockets mit membrangebundenem δ 46

3. Immunologische Untersuchung δ-haltiger Fraktionen 48

4. Bestimmung von δ/CF_1-Verhältnissen in CF_1-Präparaten und Thylakoidmembranen 50

5. Bestimmung des absoluten δ-Gehalts von Spinat-CF_1 51

4. Funktion der δ- und ε-Untereinheit bei der Interaktion von CF_1 mit der Thylakoidmembran 52

4.1. Bindung von chloroformextrahiertem CF_1 an EDTA-behandelte Thylakoide 53

4.2. Rekonstitution der Photophosphorylierung von EDTA-behandelten Thylakoiden durch δ-verarmten bzw. δ-freien CF_1 und isolierte δ-Untereinheit 55

1. Rekonstitution der Photophosphorylierung bei kompletter Besetzung der freien Bindungsstellen durch δ-verarmten CF_1 55

2. Rekonstitution der Photophosphorylierung von EDTA-Partikeln bei Limitierung der Rückbindung durch δ-freien CF_1 und steigenden δ-Mengen 57

4.3. Bindung von δ an EDTA-behandelte Thylakoide 58

4.4. Vergleich der Bindung von δ-haltigem und δ-freiem CF_1 an EDTA-behandelte Thylakoide 60

4.5. Isolierung und Charakterisierung von ε und δ, ε-freiem CF_1 $(\alpha\beta\gamma)$ 63

1. Isolierung der ε-Untereinheit aus CF_1 63

2. Eigenschaften der isolierten ε-Untereinheit 64

3. Isolierung und Charakterisierung eines δ, ε-freien CF_1-Moleküls 65

4.6. Bindung von δ, ε-freiem Salat-CF_1 an EDTA-behandelte Spinat-Thylakoide 68

IV. Diskussion 70

V. Zusammenfassung 85

VI. Material und Methoden 88

VII. Literaturverzeichnis 100

Abkürzungen

AG	Antigen
AS	Antiserum
BSA	Rinderserumalbumin
CF_0	Integraler Membranteil der ATP-Synthase aus Chloroplasten
CF_1	Peripherer Teil der ATP-Synthase aus Chloroplasten (Kopplungsfaktor)
Chl	Chlorophyll
cpm	counts per minute
DCCD	Dicyclohexylcarbodiimid
DOC	Na-desoxycholat
DTT	Dithiothreitol
ECF_1	Kopplungsfaktor aus Escherichia coli
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EID	Elektroimmunodiffusion
F_1	Kopplungsfaktor aus Mitochondrien
IEP	Isoelektrischer Punkt
M^+, M^{2+}	Ein- bzw. zweiwertige Metallionen
MES	Morpholinoäthansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
OD	Optische Dichte
OSCP	Oligomycin sensitivity conferring protein
P_a, P_i	Orthophosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PMS	Phenazinmethosulfat
PS3	Thermophiles Bakterium
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TF_1	Kopplungsfaktor aus thermophilen Bakterien
Tricin	N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

I. EINLEITUNG

Als grundlegender Prozeß für alle heute bekannten Lebensformen gilt die Bereitstellung von chemischer Energie in Form von ATP. Die Synthese dieser zentralen Verbindung wird u.a. von den plastidären, mitochondrialen und bakteriellen protonengetriebenen ATP-Synthasen (ATPasen) durch Phosphorylierung von ADP bewerkstelligt. Essentiell für die Syntheseleistung dieser membrangebundenen Enzyme ist eine enge Kopplung an die Funktion von Elektronentransport-Systemen als Produzenten einer pH-Differenz über der entsprechenden Membran. Diese pH-Differenz soll nach der chemiosmotischen Theorie von MITCHELL (118,119) die energetische Grundlage der ATP-Synthese darstellen. Trotz intensiver Erforschung seit ihrer Entdeckung (8,100) werfen die ATP-Synthasen wegen ihrer Komplexität nach wie vor zahlreiche Fragen auf und haben daher an Interesse nicht verloren. Zahlreiche Übersichtsartikel beweisen dies (2,12,55,59,62,79,113,130,132,137,139, 163,164,166,198).

Die aus verschiedenen Organismen und Organellen isolierten ATPasen weisen weitgehende Analogien auf wie z.B. in ihrem Molekulargewicht oder in ihrer Untereinheitenzusammensetzung (12). Grob betrachtet setzen sie sich aus zwei Teilen zusammen, dem hydrophoben, integralen Membranteil (F_0,CF_0), der für den Protonentransfer durch die Membran verantwortlich ist und dem hydrophilen, peripheren Anteil - auch Kopplungsfaktor genannt - der das katalytische Zentrum besitzt. Zunächst soll nur von der Chloroplasten-ATPase - dem Untersuchungsobjekt dieser Arbeit - die Rede sein.

Der ATP-Synthase-Komplex der Chloroplasten (CF_0-CF_1) ist ein Bestandteil der Thylakoidmembran. Verschiedene Untersuchungsmethoden wie Elektronenmikroskopie (64,76,117,134, 195), Hemmversuche mit Antikörpern (17,85,110) bzw. Diazobenzolsulfonsäure (65) oder Jodierung mit Lactoperoxidase (7) führten zu dem Ergebnis, daß sein peripherer CF_1-Teil auf der Außenseite der Thylakoidmembran lokalisiert ist. Aus Hemmversuchen wurde auf seine Abwesenheit in den nicht exponierten Membranbereichen, der "partition"-Region, geschlossen

(19,65,85). Somit ist CF_1 also nur auf den sogenannten exponierten Oberflächen des Lamellarsystems zu finden (28)(Abb.1).

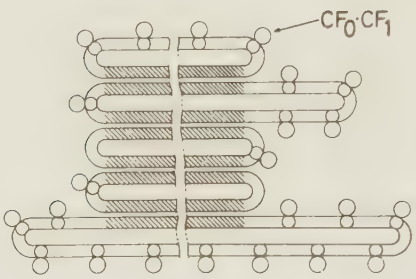


Abb. 1: Ausschnitt aus dem Thylakoidmembransystem der Chloroplasten (schematisch). Die photosynthetische ATP-Synthase (CF_0-CF_1) ist nur auf exponierten Membranbereichen lokalisiert. Schraffiert: Nicht exponierte Membranflächen. (Nomenklatur der Membranbereiche nach 28).

Bestimmungen des thylakoidgebundenen CF_1 bezogen auf Chlorophyll lieferten unterschiedliche Werte von 1 CF_1/60 Chl bis 1 CF_1/980 Chl (21,22,60,66,84,116,122,134,178), so daß eine Erklärung dieser Diskrepanzen bzw. eine Neubestimmung des CF_1/Chl-Verhältnisses erforderlich erscheint (siehe Tab. 2C).

Durch seine Lokalisation auf den exponierten Bereichen der Thylakoide lassen sich Reaktionen verschiedener (auch hydrophiler) Agenzien mit CF_1 gut studieren (65,85,110), ohne dabei eine drastische Veränderung oder Zerstörung der Thylakoidmembran vornehmen zu müssen. Wie andere periphere Membranproteine (168,169) läßt sich auch CF_1 durch relativ milde Behandlungen von der Membran abdissoziieren. Dies kann z.B. durch Einwirkung von EDTA oder Pyrophosphat auf die Thylakoide geschehen (9,74,77,178). Mit der CF_1-Ablösung erniedrigt sich die Photophosphorylierungs-Kapazität in der Membranfraktion bei gleichzeitiger Beschleunigung des photosynthetischen Elektronentransports (9,77). Das von der Membran abgelöste Enzym hat die Fähigkeit zur ATP-Synthese verloren, ist aber nach verschiedenen Aktivierungsmethoden in der Lage, ATP zu hydrolysieren (57,189).

Nach der Zerlegung eines Systems ergibt sich gleich das Problem, es mit Hilfe von Rohfraktionen oder der daraus gereinigten Komponenten wieder zu rekonstituieren. Auf diese Weisen gelang tatsächlich eine Rekonstitution der Photophosphorylierung in EDTA-Partikeln (9,189). Allerdings lagen die

rekonstituierten Photophosphorylierungs-Kapazitäten weit unter denen der Kontrollpartikel. Eine fast komplette Rekonstitution gelang nur mit Partikeln, die einen hohen Restgehalt an CF_1 besaßen (24,167). Als erste wiesen McCARTY & RACKER (111) darauf hin, daß Thylakoidmembranen, die nach EDTA-Behandlung keine Photophosphorylierung mehr zeigten, durchaus noch einen beträchtlichen Anteil an CF_1 enthalten konnten. Hieraus schlossen sie auf eine doppelte Funktion des CF_1, nämlich (a) die Enzymkatalyse und (b) eine strukturelle Aufgabe, die in der Aufrechterhaltung des für die Photophosphorylierung notwendigen Protonengradienten durch Abdichtung der Membran für H^+ besteht. Aufgrund dieser Erkenntnis und der Tatsache, daß eine Rekonstitution der Photophosphorylierung fast immer nur zu einem geringen Prozentsatz gelingt, ergab sich die Frage, ob ein an die Membran zurückgebundener CF_1 wieder beide Funktionen wahrnehmen kann. BERZBORN & SCHRÖER (24) und SELMAN & DURBIN (161) konnten auf verschiedene Weise zeigen, daß zumindest ein Teil des an EDTA-Partikel zurückgebundenen CF_1 wieder katalytisch aktiv wird.

Die zur Rekonstitution der Photophosphorylierung von EDTA-Partikeln notwendige Rückbindung von CF_1 wurde bisher wenig untersucht. Die von AVRON (9) gefundene Abhängigkeit der Rekonstitution von Magnesiumionen fand in den Untersuchungen von BENNUN & RACKER (16) ihre Erklärung. Sie zeigten mit Hilfe von radioaktiv markiertem CF_1, daß die Rückbindung an die Membran zweiwertige Metallionen erfordert. Heute weiß man, daß zur CF_1-Bindung oder auch zur Verhinderung des EDTA-Effekts die verschiedensten ein- und mehrwertigen Kationen dienen können (24, 26,74,146,178,182). Allerdings wurden direkte Messungen der Bindung bisher nur in geringem Umfang durchgeführt (16,66). Meistens wurde indirekt über die Bestimmung der Photophosphorylierung auf eine CF_1- Bindung geschlossen (182). Da aber der CF_1-Gehalt auf der Membran und die Photophosphorylierung nicht proportional voneinander abhängig sind (24,66,111) und zudem die rekonstituierte Kapazität noch von anderen Faktoren als dem CF_1-Gehalt abhängt (66,167), stehen tatsächliche Messungen zur CF_1-Rückbindung noch aus.

Die bisher vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, daß die Rolle der Kationen bei der CF_0-CF_1-Bindung in der Abschirmung von Oberflächenladungen besteht (26,146,182), wie sie durch die Theorie von GOUY & CHAPMAN erklärt wird (13), da (a) keine Spezifität für ein bestimmtes Kation vorliegt und (b) ein drastischer Unterschied im Bedarf verschiedenwertiger Kationen gegeben ist (146,182). Wie von ROOS (146) und BERZBORN & ROOS (26) erstmals formuliert, bewirkt eine bloße Verhinderung der Abstoßung durch einwertige Kationen noch keine Bindung. So ist zwar die Funktion der Metallionen geklärt, die Frage nach der Art der CF_0-CF_1-Bindung aber weiterhin offen.

Die Analyse des CF_1-Teils durch denaturierende Gelelektrophorese mit SDS ergab eine Zusammensetzung aus 5 verschiedenen Untereinheiten (20,99), die mit abnehmendem Molekulargewicht als α, β, γ, δ und ε bezeichnet werden. Mitochondriale und bakterielle ATPasen wiesen ebenfalls 5 verschiedene Untereinheiten mit ähnlichen Molekulargewichten auf (12). Daraus ergeben sich zwei Probleme, die bis heute nicht bzw. nicht überzeugend geklärt wurden.

Die Frage nach der Untereinheiten-Stöchiometrie, d.h. nach der Anzahl der einzelnen Untereinheiten pro F_1- bzw. CF_1-Molekül ist immer noch Gegenstand kontroverser Meinungen (12, 52,59,62). Selbst die Zahl der größeren Untereinheiten (α, β,γ) ist nicht mit Sicherheit bekannt. Tab. 1 (S.5) zeigt eine Auswahl von Stöchiometriebestimmungen, die diese Tatsache verdeutlichen soll. Was die kleinen Untereinheiten (δ, ε) anbelangt, so sind hier die Ergebnisse noch unsicherer. Neben den Schwierigkeiten der Bestimmungsmethodik taucht bei ihnen das zusätzliche Problem auf, daß während einer F_1- oder CF_1-Präparation ein teilweiser Verlust der kleinen Untereinheiten stattfinden kann, worauf schon McCARTY (113) und BAIRD & HAMMES (12) hinweisen. Die bestimmten Stöchiometrien stellen also Minimalwerte dar.

Die gleichartige Zusammensetzung der Protonen-ATPasen verschiedener Herkunft aus 5 Untereinheiten mit ähnlichen Molekulargewichten gibt Anlaß zu der Hypothese, daß diese Untereinheiten homologe Proteine im Sinne der Phylogenie darstellen und jeweils gleiche Funktionen im Gesamtenzym wahr-

Kopplungsfaktor aus	Stöchiometrie	Methode	Autor
Chloroplasten	$\alpha_2\beta_2\gamma_2\delta\varepsilon_2$	b	20
Chloroplasten	$\alpha_2\beta_2\gamma\delta\varepsilon_2$	a	10
Chloroplasten	$\alpha_2\beta_2\gamma\delta\varepsilon_2$	b	29
Chloroplasten	$\alpha_2\beta_2\gamma\delta\varepsilon_2$	c	130
Mitochondrien, Rattenleber	$\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$	b	39
Mitochondrien, Rattenleber	$\alpha_2\beta_2$	g	5
Mitochondrien, Rinderherz	α_2-γ_2-ε_2	e	164
Mitochondrien, Hefe	$\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$	d	183
Mitochondrien, Hefe	$\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon_2$	a	184
Escherichia coli	$\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$	c	34
Escherichia coli	$\alpha_2\beta_2\gamma_2\delta_{1-2}\varepsilon_2$	f	191
Micrococcus lysodeikticus	$\alpha_3\beta_3\gamma_2$	f	92
PS 3	$\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$	c	82

Tab. 1: Einige Bestimmungen von Untereinheiten-Stöchiometrien verschiedener Kopplungsfaktoren. Erklärung der Methoden: a: Kreuzvernetzung der Untereinheiten. b: Färbeintensität der Untereinheiten auf denaturierenden Gelen. c: Radioaktive Markierung durch Wachstum auf einer radioaktiven Kohlenstoffquelle. d: Wie c + Immunpräzipitation des markierten Komplexes. e: Markierung von SH-Gruppen. f: Rekonstitution des F_1-Teils aus den isolierten Untereinheiten. g: Röntgenbeugung an F_1-Kristallen.

nehmen. Dies konnte allenfalls für die α, β und γ- Untereinheit wahrscheinlich gemacht werden (12,63,181). Für ε aus CF_1 haben NELSON et al. (124) eine Inhibitorwirkung auf die ATPase beschrieben. Aus Mitochondrien konnte zwar ebenfalls ein Inhibitor der F_1-ATPase isoliert werden (75,142), die Identität mit der ε-Untereinheit war aber zunächst umstritten und gilt heute als widerlegt (39,40,164). Schließlich zeigt ε aus dem thermophilen Bakterium PS 3 keine Inhibitorwirkung auf die ATPase (201).

Die Aufgabe der δ-Untereinheit besteht bei E·CF_1 und TF_1 in der Bindung des F_1-Teils an die Membran (171,175,201). Für F_1-δ aus Mitochondrien wurde eine solche Funktion bisher nicht bestätigt, sie wird hier zusätzlichen Proteinen zugeschrieben, die als F_6 bzw. OSCP (oligomycin sensitivity conferral protein) bezeichnet werden (86,164,186,190). Die in der Literatur oft wiederholte Meinung, daß auch für die Bin-

dung von CF_1 an die Thylakoidmembran die δ-Untereinheit notwendig sei (12,62,132,166,175), beruht nur auf einem sehr fragwürigen Versuch von YOUNIS et al. (204). Entgegen aller Meinung haben NELSON & KARNY (129) die Beteiligung von δ an der CF_1-Bindung nicht gezeigt, sondern nur, daß es zur Rekonstitution der Photophosphorylierung von EDTA-Partikeln in Kombination mit δ-freiem CF_1 notwendig ist. Somit ist meiner Meinung nach die Funktion von δ im ATP-Synthase-Komplex aus Chloroplasten noch nicht eindeutig geklärt. Da - wie schon am Beispiel von ε gezeigt - entsprechend bezeichnete Untereinheiten nicht unbedingt analoge Funktionen in ATPasen verschiedener Herkunft haben müssen, ist auch noch offen, ob ε aus CF_1 ähnlich wie bei F_1 aus E. coli (175) an der Bindung der ATPase an die Membran beteiligt ist.

II. PROBLEMSTELLUNG

Die vorliegende Arbeit befaßt sich im wesentlichen mit strukturellen und funktionalen Aspekten der CF_0-CF_1-Interaktion. Hierunter ist zum einen die Frage nach der chemischen Natur der CF_0-CF_1-Bindung verstehen. Zum anderen soll untersucht werden, welche Rolle die kleinen Untereinheiten δ und ε bei der Interaktion von CF_1 mit CF_0 spielen. Diese Fragen sollen mit Hilfe einer immunologischen Technik zur Bestimmung von CF_1 und δ gelöst werden. Diese hier vorgestellte neue Methode soll es erlauben, CF_1 und δ in membrangebundener und freier Form absolut bestimmen zu können, so daß die Bindung von CF_1 und δ an die Membran direkt gemessen werden kann. Mit Hilfe der Methode sollen sowohl die Stöchiometrie von CF_1/Chlorophyll in Thylakoidmembranen als auch der absolute δ-Gehalt pro CF_1-Molekül bestimmt werden.

Die Arbeit gliedert sich in 3 verschiedene Aufgabenbereiche:

1. Ausarbeitung von immunchemischen Bestimmungsmethoden für CF_1 und δ und die damit durchgeführten Stöchiometriebestimmungen.

2. Isolierung der für die Bindungs- und Rekonstitutionsversuche erforderlichen Proteine wie CF_1, δ-freier CF_1, δ,ε-freier CF_1, δ und ε.
3. Bindungs- und Rekonstitutionsversuche mit CF_1 und Untereinheiten-defizienten CF_1-Molekülen in Kombination mit den isolierten Untereinheiten. Hierbei soll die Bindung von CF_1 und δ an die Thylakoidmembran mit der neuen Immunmethode bestimmt werden.

III. ERGEBNISSE

1. Quantitative Bestimmung von CF_1 durch Elektroimmunodiffusion (= Rocketimmunelektrophorese)

Für die geplanten Studien zur CF_0-CF_1-Bindung sowie für Absolutbestimmungen von CF_1 in Membranfraktionen soll hier eine neue quantitative Analysenmethode für CF_1 vorgestellt werden. Die bisher angewandten enzymatischen Bestimmungsmethoden basieren auf der Messung der ATPase-Aktivität von CF_1 nach Aktivierung durch Trypsin (189) oder Hitze in Gegenwart von Thiol-Reagenzien (57). Beide Methoden sind aus folgenden Gründen für meine Untersuchungen nicht geeignet:

a. Nach der Methode von FARRON & RACKER (57) kann nur freier nicht aber membrangebundener CF_1 bestimmt werden.

b. Der Arbeitsaufwand der Methode von VAMBUTAS & RACKER (189) begrenzt die Anzahl der Analysenproben. Außerdem ist nicht klar, inwieweit mit dieser Methode durchgeführte Bestimmungen von freiem bzw. membrangebundenem CF_1 miteinander vergleichbar sind (28,120).

c. Da sich verschiedene CF_1-Präparationen in ihren Aktivitäten unterscheiden (24), kann für Absolutbestimmungen keine Eichung über die Aktivität vorgenommen werden. Beide Bestimmungsmethoden liefern also nur relative Werte.

Als geeignet für meine Untersuchungen erwies sich eine spezifische Immunmethode, die Elektroimmunodiffusion oder Rocketimmunelektrophorese (94). Bei dieser Methode wird die zu bestimmende Substanz elektrophoretisch in ein mit spezifischen Antikörpern beladenes Agarosegel hineingezogen, wobei sich ein "rocket"-förmiges Präzipitat bildet (Abb. 2). Die Länge dieses Präzipitats soll der Antigenmenge proportional sein. Im folgenden wird die Ausarbeitung und Ausführung der neuen Methode besprochen und diskutiert, wobei es im wesentlichen um zwei Fragen geht:

a. Wie ist CF_1 membrangebunden mit der EID bestimmbar?

b. Inwieweit lassen sich Bestimmungen von freiem und membrangebundenem CF_1 vergleichen?

1.1. Rocketbildung mit isoliertem CF_1

Nicht membrangebundene Proteine lassen sich meist einfach mit der EID bestimmen. So hat diese Methode sogar Eingang in die klinische Diagnostik gefunden (41,46). Von seinem Membranteil (CF_0) abdissoziierter, hydrophiler CF_1 läßt sich mit dieser Methode ebenfalls leicht quantifizieren.

Von den verschiedenen in unserem Labor bereits vorhandenen Antiseren gegen CF_1 wurde das AS 152-t für die meisten Versuche verwendet, da es auch mit CF_1-Rohfraktionen nur eine einzige Rocket ergab (Abb. 2). Im Ouchterlony-Test bildet es mit tritongelösten Thylakoidmembranen nur eine Präzipitationslinie aus, die Identität mit isoliertem CF_1 aufweist (Abb. 8). Die mit gereinigtem CF_1 zusätzlich auftretende, schwache Linie mag auf Dissoziationsprodukte des komplexen CF_1-Moleküls zurückzuführen sein. Für meine Untersuchungen ist das AS 152-t also als monospezifisch für CF_1 zu bezeichnen. Abb. 3 zeigt, daß eine proportionale Abhängigkeit der Rocketlänge von der CF_1-Menge gegeben ist.

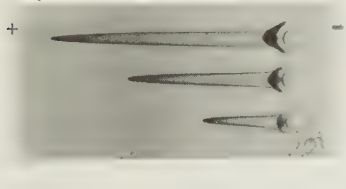


Abb. 2: Beispiel für CF_1-Rockets.
AG: In 3% Triton gelöste Spinat-Thylakoide; von oben nach unten: 6, 4 und 2μg Chlorophyll. AS: anti-CF_1 (Spinat), 25μl 152-t/10ml Gel.
Elektrophorese: 18h, 80V, 15°C.

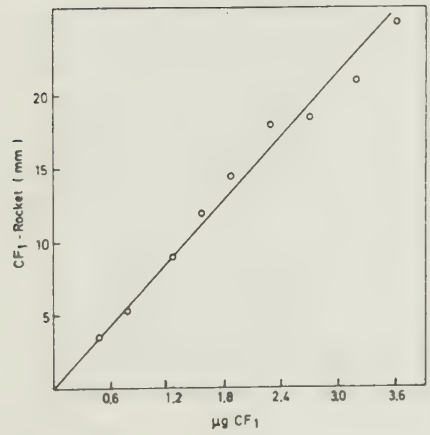


Abb. 3: Abhängigkeit der CF_1-Rocketlänge von der Antigenmenge.
AG: Isolierter CF_1 (Präp. 140, Spinat) in den angegebenen Mengen.
AS: anti-CF_1 (Spinat), 40μl 150-4/10ml Gel.
Elektrophorese: 18h, 120V, 15°C.

1.2. Elektrophoresebedingungen

Zur Erzielung optimaler Resultate ist die Wahl der angelegten Spannung von Bedeutung. Bei Feldstärken um 13V/cm ist die Wärmeentwicklung in der Agarosegelschicht so groß, daß ein sich entwickelnder Temperaturgradient eine doppelt konturierte Rocket entstehen läßt (194). Durch Erniedrigung der elektrischen Feldstärke auf 5,5V/cm läßt sich dieses Phänomen vermeiden. Gleichzeitig werden die Rockets breiter und kürzer und die Elektrophoresedauer muß erhöht werden. Routinemäßig wurden die Elektrophoresen bei Feldstärken von 3,5V/cm bzw. 5,3V/cm durchgeführt (entsprechend 80V bzw. 120V in unserer Elektrophorese-Apparatur). Zur Bestimmung der erforderlichen Elektrophoresedauer (15°C) wurden mit unterschiedlichen CF_1-Mengen die Rocketlängen in bestimmten Zeitabständen nach Elektrophoresebeginn gemessen (Abb.4). Nach 15h Elektrophoresedauer konnte auch für die längsten Rockets keine Längenzunahme mehr registriert werden. Für CF_1-Bestimmungen wurde unter den angegebenen Bedingungen deshalb eine Elektrophoresedauer von 18h eingehalten. Der verwendete Kammer- und Gelpuffer ist im Methodenteil beschrieben.

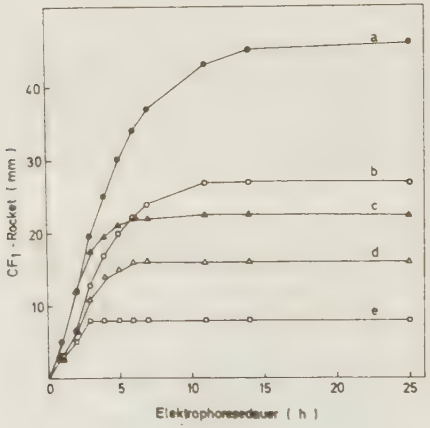


Abb. 4: Abhängigkeit der CF_1-Rocketlänge von der Elektrophoresedauer.
AG: Isolierter CF_1 (Präp. 86, Spinat); 2,5 (c) bzw. 5µg Protein (a). Tritongelöste Thylakoide (Spinat), 2 (e), 3,5 (d) bzw. 6,9µg Chl (b).
AS: anti-CF_1 (Spinat), 25 µl 152-t/10ml Gel.
Elektrophorese: 25h, 80V, 15°C.
Nach Beginn der Elektrophorese wurden die Rocketlängen zu den angegebenen Zeitpunkten im Dunkelfeld bestimmt.

1.3. Behandlung von Thylakoidmembranen zur Bestimmung von membrangebundenem CF_1

Zur Quantifizierung von membrangebundenem CF_1 mit der EID

muß der CF_1 vollständig in Lösung gebracht werden. Dies kann einerseits durch Extraktion (60) oder durch komplette Auflösung der Thylakoidmembranen geschehen. Da die CF_1-Dissoziation von der Membran durch EDTA-, Pyrophosphat- oder Chloroform-Behandlung nicht quantitativ erfolgt (Daten nicht gezeigt), entschloß ich mich für die zweite Möglichkeit. Für diesen Zweck erwies sich Triton X-100 als geeignetes Detergenz. Es soll die Quartärstruktur von Proteinen nicht zerstören (72).

Aus Tab. 2 geht hervor, in welcher Konzentration Triton im Verhältnis zur Chlorophyllmenge eingesetzt werden muß, um die Thylakoide vollständig zu lösen. Hierzu wurden Thylakoide bei verschiedener Detergenz-Konzentration gelöst und als Kriterium für die Membran- bzw. CF_1-Solubilisierung nach Zentrifugation Chlorophyll und CF_1 im Überstand bestimmt. Bei Chlo-

mg Chl/ml (susp.)	% Triton	mg Chl/ml (Triton)	mm Rocketlänge	mm Rocketlänge/10µg Chl
0,33	1	0,35	11	55
0,33	2	0,33	11,5	55
0,66	1	0,64	21	51,5
0,66	2	0,66	22	54
0,66	3	0,66	22,5	55
1,0	1	0,68	23	38,5
1,0	2	0,95	29,5	49
1,0	3	1,02	32	53,5

Tab. 2: Bestimmung von CF_1 durch Elektroimmunodifusion nach Auflösung von Thylakoiden bei verschiedener Tritonkonzentration. Suspensionen von Thylakoidmembranen in 10mM NaCl werden mit Triton X-100 auf den angegebenen Chlorophyllgehalt verdünnt (Spalte 1), so daß man gleichzeitig die angegebene Tritonkonzentration erhält (Spalte 2). Nach kurzem Schütteln werden die Proben zentrifugiert (EPPENDORF-Mikrozentrifuge) und im Überstand die Chlorophyllkonzentration (Spalte 3) und und der CF_1 durch EID bestimmt. Die gemessenen Rocketlängen (Spalte 4) werden auf 10µg Chl (susp.) bezogen (Spalte 5). AS: anti-CF_1 (Spinat), 50µl 152-t/ 10ml Gel. Elektrophorese: 140min, 300V, 4°C (Kurzzeitelektrophorese).

rophyll-Konzentrationen um 0,3 mg/ml reicht 1% Triton zur Solubilisierung der Membranen aus, da eine Erhöhung der Detergenz-Konzentration keine Erhöhung der relativen Rocket-

länge bewirkt (Tab. 2, Spalte 5). Für die in dieser Arbeit maximal eingesetzten Chlorophyll-Konzentrationen von 1mg/ml sind 3% Triton notwendig. Diese Detergenzkonzentration wurde routinemäßig verwendet. Die Ergebnisse des in Tab. 3 dargestellten Versuchs schließen eine mögliche Abhängigkeit der CF_1-Rocketlänge von der Tritonkonzentration oder dem Triton/CF_1-Verhältnis aus; eine wesentliche Voraussetzung zur Bestimmung von membrangebundenem CF_1. Ebenso läßt Triton die mit freiem CF_1 erhaltene Rocketlänge unbeeinflußt (Daten nicht gezeigt).

Probe	mm CF_1-Rocket
Thylakoide in 2% Triton + gleiches Vol.	
H_2O	15,5
2% Triton	15,5
4% Triton	16,0

Tab. 3: Einfluß der Triton-Konzentration auf die CF_1-Rocketlänge von "membrangebundenem" CF_1.
0,4 ml Thylakoid-Suspension (2mg Chl/ml in 10mM NaCl) werden mit 0,2ml 6% Triton kurz geschüttelt und dann 4 min in einer EPPENDORF-Mikrozentrifuge zentrifugiert. Aliquots des klaren, dunkelgrünen Überstands werden wie in der Tabelle angegeben auf 1, 2 bzw. 3% Triton gebracht und mit diesen Lösungen eine EID durchgeführt.
AS: anti-CF_1 (Spinat), 25µl 152-t/10ml Gel.
Elektrophorese: 18h, 80V, 15°C.

Wie für isolierten CF_1 gilt auch für membrangebundenen (≙ tritongelöste Thylakoide) die proportionale Abhängigkeit der Rocketlänge von der Antigenmenge (Abb. 3 und 5). Gleichzeitig soll die Abb. 5 die Empfindlichkeit der Methode verdeutlichen: Noch mit 42ng Chlorophyll (7µg Chl/ml) und damit ca. 20ng CF_1 erhält man eine CF_1-Rocket. Durch weitere Erniedrigung der Antiserum -Konzentration im Agarosegel (es wurden hier nur 10 µl des AS 150-4 verwendet, vgl. Abb. 3) könnte die Empfindlichkeit evtl. noch gesteigert werden.

Die bis hierher erarbeitete Methodik erlaubt jeweils die relative Bestimmung von isoliertem bzw. membrangebundenem CF_1. Ob sich die Ergebnisse beider Bestimmungen miteinander vergleichen lassen ist allerdings noch nicht geklärt. Dieser

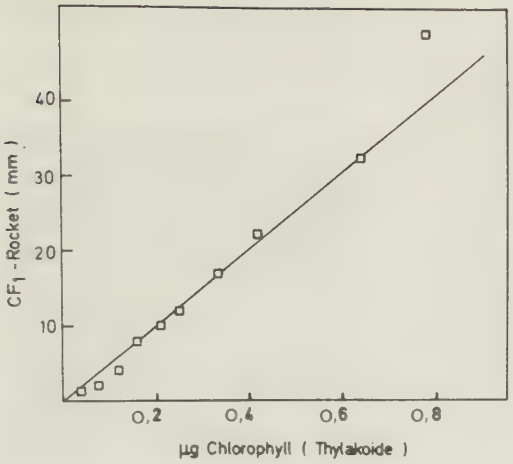


Abb. 5: Bildung von CF_1-Rockets mit tritongelösten Thylakoiden: Abhängigkeit der Rocketlänge von der Antigenmenge. AG: Tritongelöste Thylakoide aus Spinat (Chlorophyllmengen wie angegeben, 3% Triton). AS: anti-CF_1 (Spinat), 10µl 150-4/ 10ml Gel. Elektrophorese: 18h, 120V, 15°C.

Frage soll in den folgenden Abschnitten nachgegangen werden. Ihre Beantwortung ist für die Möglichkeit einer Absolutbestimmung von membrangebundenem CF_1 durch Eichung mit gereinigtem CF_1 von Bedeutung.

1.4. Charakterisierung der ATPase aus tritongelösten Thylakoidmembranen

Da Triton als mildes Detergenz keine Dissoziation von Proteinen in Untereinheiten bewirken soll (72), geht möglicherweise durch Tritonbehandlung von Thylakoiden der gesamte CF_0-CF_1-Komplex in Lösung, wie für den F_0-F_1-Komplex aus Rhodospirillum rubrum nachgewiesen (121,125). In Immunpräzipitaten der tritongelösten ATPase aus Thylakoiden mit anti-CF_1 findet man in der denaturierenden Gelelektrophorese mit SDS neben den 5 Untereinheiten des CF_1-Teils weitere Peptide (Abb. 6). Diese können nach Angaben aus der Literatur (140, 130) und durch den Vergleich mit isoliertem CF_0-CF_1-Komplex (KLEIN-HITPASS, unveröff. Daten) als Untereinheiten des CF_0-Membranteils identifiziert werden. In den "Triton-Membran-Lösungen" liegt also der assoziierte CF_0-CF_1-Komplex vor.

Abb. 6: Immunpräzipitation des CF_0-CF_1-Komplexes aus tritongelösten Thylakoiden mit anti-CF_1. 0,5ml Thylakoide (1mg Chl/ml) in 3% Triton wurden mit 0,3ml AS 152-t (anti-CF_1, Spinat) 0,5h inkubiert, das Präzipitat 2x mit 5mM Tricin pH 7,8, 0,2% Triton gewaschen und in 100µl Proteinlösungsgemisch (SDS-PAGE) gelöst. Hiervon wurden 10µl in der Elektrophorese eingesetzt (D). Vergleichsproteine: A: Proteolipid aus CF_0. B: CF_0-CF_1-Komplex. C: CF_1. A und B wurden freundlicherweise von Herrn KLEINHITPASS zur Verfügung gestellt. CDM_g und CDM_k: Große bzw. kleine Untereinheit der Carboxydismutase.

Mit Hilfe der Charge-shift-Elektrophorese (73)(siehe Methodenteil) sollte dieses Ergebnis weiter unterstützt werden. Die Methode dient der Unterscheidung hydrophiler von amphiphilen Proteinen. Hydrophiler CF_1 und amphiphiler CF_0-CF_1 sollten sich also mit dieser Methode unterscheiden lassen, die auf der veränderten elektrophoretischen Beweglichkeit amphiphiler Proteine in Gegenwart geladener Detergenzien beruht. Wie die Abb. 7 zeigt, verändert die Anwesenheit von Na-desoxycholat tatsächlich die elektrophoretische Mobilität der ATPase aus tritongelösten Thylakoiden, die des CF_1 bleibt unverändert. Mit Cetyltrimethylammoniumbromid als positiv geladenem Detergenz erhält man keine Präzipitate; wahrscheinlich wird die ATPase denaturiert. Wie später noch gezeigt wird (Kap. 3.4.2.), bewirkt Na-desoxycholat eine Dissoziation des CF_0-CF_1-Komplexes. Die in der Charge-shift-Elektrophorese gefundene Veränderung der CF_0-CF_1-Mobilität beruht also wahrscheinlich auf Dissoziation. Hierfür spricht auch die identische Wanderungsgeschwindigkeit von CF_1 bzw. "CF_0-CF_1" in Gegenwart von Na-desoxycholat (Abb. 7,B). Die Verschiedenheit der durch Tritonlösung von Thylakoiden erhaltenen ATPase (CF_0-CF_1) von freiem CF_1 äußert sich in der unterschiedlichen

Mobilität in alleiniger Gegenwart von Triton (Abb. 7,A). Hieraus kann aber kein Schluß auf amphiphile Eigenschaften der tritongelösten ATPase gezogen werden.

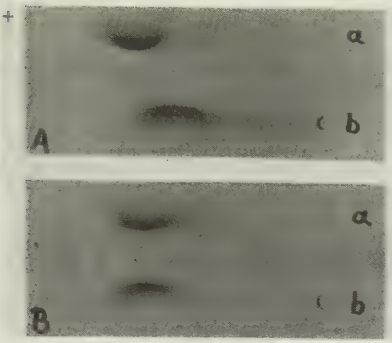
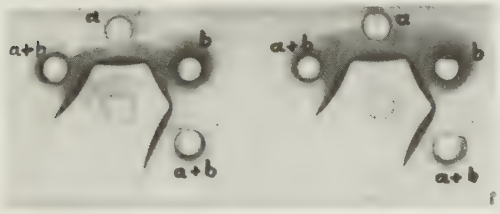


Abb. 7: Charge shift Elektrophorese mit isoliertem CF_1 und tritongelösten Thylakoiden.
AG: Je 2µl (a):Isolierter CF_1 (Präp. 91, Spinat), 0,75mg/ml in 3% Triton, 20 mM Tricin pH 7,8 und 1mM EDTA. (b): Thylakoidmembranen (1,25mg Chl/ml) in 3% Triton, 5mM NaCl.
Elektrophorese: 30min, 300V, RT.
AS: anti-CF_1 (Spinat), 40µl 152-t (im Graben).
Diffusion: 18h.
Gel: 0,8% Agarose. Gelpuffer: Tris-Barbital-Fertigpuffer der Fa. CAMAG mit 0,5% Triton (A) bzw. 0,5% Triton, 0,25% DOC (B). Elektrodenpuffer: wie Gelpuffer (siehe: Methodenteil).

Durch die Immunpräzipitation (Abb. 6) ist eindeutig gezeigt, daß Triton-Membran-Lösungen den assoziierten CF_0-CF_1-Komplex enthalten. Bei einer Analyse mit der neuen Immunmethode wird also auch der gesamte Komplex präzipitiert. Diese Tatsache führt zu der Frage, ob sich mit anti-CF_1 erhaltene CF_1- und CF_0-CF_1-Rockets miteinander vergleichen lassen.

Eine wesentliche Voraussetzung für einen solchen Vergleich ist die immunologische Identität von CF_1 und CF_0-CF_1 gegenüber den verwendeten Antiseren. Der in Abb. 8 dargestellte Ouchterlony-Test zeigt, daß diese Forderung für die AS 150-4



A B

Abb. 8: Ouchterlony-Test mit CF_1 und tritongelösten Thylakoiden.
AG: a. Isolierter CF_1 (Präp. 140, Spinat), 0,8 mg Protein/ml in 40 mM Tricin, pH 7,8, 2mM EDTA.
b. Tritongelöste Thylakoide (1,3 mg Chl/ml) in 3% Triton, 7mM NaCl. a+b. Antigene a und b 1:1 gemischt. AS: anti-CF_1 (Spinat): A. 150-4, B. 152-t (im zentralen Loch).

und 152-t erfüllt wird. Nur diese beiden Antiseren gegen CF_1 wurden in dieser Arbeit für Rocketimmunelektrophoresen verwendet. Eine zufällige Überlagerung mehrerer Präzipitationslinien - und damit nur eine vortäuschend - wurde ausgeschlossen. Durch Zumischen von gereinigtem CF_1 zur Rohfraktion (aufgelöste Thylakoide) wird die CF_1-Konzentration gegenüber anderen Substanzen erhöht. Hierdurch würden evtl. vorhandene weitere Präzipitationslinien gegenüber dem CF_1-Präzipitat verschoben. Die beiden Antiseren sind also als monospezifisch für CF_1 anzusehen.

Einen guten Beweis für die direkte Vergleichbarkeit der Längen von CF_1- bzw. CF_0-CF_1-Rockets in der EID mit anti-CF_1 liefert der in Tab. 4 dargestellte Versuch. Er zeigt, daß die Summen der Rocketlängen aus EDTA-Partikeln (CF_0-CF_1) und ihren entsprechenden EDTA-Überständen (CF_1) konstant sind und der mit Kontrollpartikeln erhaltenen Rocketlänge entsprechen. Somit ist also eine Absolutbestimmung von membrangebundenem CF_1 durch Eichung mit gereinigtem CF_1 möglich.

Thylakoidmembranen	mm CF_1-Rocket/10 µg Chl		
	membrangebundener CF_1	CF_1 im Überstand	Summe
unbehandelt	50,9	0	50,9
EDTA-behandelt + 3mM NaCl	19,4	31,8	51,2
EDTA-behandelt ohne NaCl	8,5	43,2	51,7

Tab. 4: Vergleich der CF_1-Rocketlängen von Membranfraktionen und ihren nach EDTA-Behandlung CF_1-haltigen Überständen. Unbehandelte und EDTA-behandelte Thylakoidmembranen (Methodenteil) werden in 3% Triton (Endkonz.) gelöst und die entsprechenden Überstände im Rotationsverdampfer bei 25°C 10fach konzentriert. Sie werden mit einer 9%igen Tritonlösung auf 3% Triton gebracht. Die tritongelösten Membranen (mit 0,5 - 1 mg Chl/ml) und die Überstände werden mit der EID auf ihren CF_1-Gehalt analysiert und die gemessenen Rocketlängen auf 10 µg Chlorophyll bezogen. AS: anti-CF_1 (Spinat), 25µl/10ml Gel. Elektrophorese: 18h, 80V, 15°C.

1.5. Einfluß verschiedener Substanzen auf die Rocketlänge

Da die zu analysierenden CF_1-Proben oft unterschiedliche, nicht genau bekannte Konzentrationen an verschiedenen Substanzen enthalten, muß bei vergleichenden Bestimmungen ein Einfluß dieser Substanzen auf die Rocketlänge ausgeschlossen

sein. Die in Frage kommenden Verbindungen wurden in verschiedenen Konzentrationen getestet. Hierbei zeigte sich, daß NaCl bis 100mM, EDTA bis 7,5mM, $(NH_4)_2SO_4$ bis 50mM, Saccharose bis 100mM, Tricin bis 50mM und Triton bis 3% keinen Einfluß auf die Rocketlänge ausüben (Einzeldaten nicht gezeigt). Dies gilt gleichermaßen für freien wie für membrangebundenen CF_1 (vgl. auch Tab. 3). Diese Ergebnisse sind Voraussetzung für eine einfache, routinemäßige CF_1-Bestimmung.

Die Anwesenheit von Na-desoxycholat in der Probenlösung wirkt sich sowohl auf die Länge als auch auf die Form der CF_1-Rockets aus (nicht gezeigt). Bei Verwendung von Na-desoxycholat ist deshalb eine identische Detergenzkonzentration in den einzelnen Analysenproben einzuhalten.

1.6. Statistische Bewertung der neuen Immunmethode zur CF_1-Bestimmung

Wichtig für eine Methode ist die Reproduzierbarkeit der mit ihr erzielten Ergebnisse. Unter diesem Aspekt wurde die CF_1-Bestimmung durch EID untersucht. Zu diesem Zweck wurden gleichartige, voneinander unabhängige Versuche ausgewertet. Bei der Bestimmung von membrangebundenem und isoliertem CF_1 durch EID ergaben sich bei jeweils 4 Parallelversuchen geringe, akzeptable Abweichungen vom Mittelwert (Tab. 5 und 6).

Tritongelöste Thylakoide (μg Chl)	mm CF_1-Rocket aus Versuch 1	2	3	4	M $\pm$ s
6	17	16,5	17	16	16,6 $\pm$ 0,7
4	11	11	11,5	11,5	11,3 $\pm$ 0,3
2	7	6	7	6,5	6,6 $\pm$ 0,5

Tab. 5: Statistische Auswertung: Bestimmung von membrangebundenem CF_1 durch EID. In vier voneinander unabhängigen Versuchen wurden Thylakoidmembranen aus Spinat isoliert und in 3% Triton (Endkonz.) gelöst. Mit den angegebenen Chlorophyllmengen wurde eine EID durchgeführt (Vol. jeweils 6μl). Angegeben sind die Rocketlängen und die daraus berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen (M $\pm$ s). AS: anti-CF_1 (Spinat), 50μl 152-t/10ml Gel. Elektrophorese: 18h,80V, 15°C.

Für Absolutbestimmungen von CF_1 durch Eichung mit gereinigtem CF_1 ist Voraussetzung, daß verschiedene CF_1-Präparate

mit annähernd gleicher Reinheit (Abschätzung nach SDS-Gel-Analyse) unter identischen Bedingungen gleich lange CF_1-Rockets ergeben. Wie Tab. 7 zeigt, wird auch diese Voraussetzung erfüllt.

µg Protein	mm CF_1-Rocket aus Versuch 1	2	3	4	M ± s
5,0	29,5	26	30,5	26	28,0 ± 2,3
2,5	-	14,5	14	14,5	14,5 ± 0,5

Tab. 6: Statistische Auswertung: Bestimmung von isoliertem CF_1 durch EID. In vier voneinander unabhängigen Versuchen wurde eine EID mit isoliertem CF_1 (Präp. 86, Spinat) durchgeführt. Angaben wie in Tab. 5. AG: 2,5 bzw. 5µg CF_1 in 40 mM Tricin pH 7,8, 2mM EDTA, 1,7% Triton. AS und Elektrophorese wie in Tab. 5.

µg Protein	mm CF_1-Rocket mit Präparat 86	97	98	M ± s
6	33	34,5	35	34,2 ± 1,0
4	22	24	24	23,3 ± 1,2

Tab. 7: Statistische Auswertung: Vergleich von CF_1-Rocketlängen verschiedener CF_1-Präparate. AG: Jeweils 4 bzw. 6µg der CF_1-Präparate 86, 97 und 98 (Spinat) in 26mM Tricin pH 7,8, 1,3mM EDTA, 2% Triton. Angaben, AS und Elektrophorese wie in Tab. 5.

1.7. Bestimmung des CF_1/Chlorophyll-Verhältnisses in Thylakoidmembranen durch Elektroimmunodiffusion

Wie schon in der Einleitung erwähnt, divergieren die bisher veröffentlichten CF_1/Chl-Verhältnisse beträchtlich. Eine somit erforderliche Neubestimmung des Wertes ist mit der neuen immunchemischen Methode einfach durchzuführen. Die Kenntnis des absoluten CF_1-Gehalts von Thylakoidmembranen ist nicht nur zum Verständnis von Struktur-Funktions-Beziehungen interessant, sondern hat auch für die in dieser Arbeit durchgeführten Bindungsversuche eine praktische Bedeutung, indem die benötigten CF_1-Mengen abgeschätzt werden können.

Zur Bestimmung des CF_1/Chl-Verhältnisses in Thylakoiden wurde mit tritongelösten Membranen und gereinigtem CF_1 eine Rocketimmunelektrophorese durchgeführt. Aus den erhaltenen

Rocketlängen kann das Verhältnis direkt berechnet werden:

Tritongelöste Membranen (6µg Chl): 17,8mm CF_1-Rocket
(Mittelwert aus 12 Bestimmungen)

Gereinigter CF_1 (Präp. 86)(5µg Protein): 28,8mm CF_1-Rocket
(Mittelwert aus 6 Bestimmungen)

Membranen und CF_1 in 3% Triton. AS: anti-CF_1 (Spinat) 50µl 152-t/10ml Gel. Elektrophorese: 18h, 80V, 15°C.

$$\text{mg } CF_1/\text{mg Chl} = \frac{\mu g\ CF_1 \cdot \text{mm } CF_1\text{-Rocket (Chl)}}{\mu g \text{ Chl} \cdot \text{mm } CF_1\text{-Rocket } (CF_1)} = \underline{0,51}$$

Das molare Verhältnis ergibt sich durch Einsetzen der entsprechenden Mole Chlorophyll bzw. CF_1 (Molekulargewichte: Chl: 900; CF_1: 325000, nach 56). Es beträgt <u>1 Mol CF_1/690 Mol Chlorophyll</u>. Mit unter identischen Bedingungen angezogenem Spinat konnte dieser Wert in vielen Versuchen bestätigt werden. Variation der Lichtintensität bei der Anzucht führt allerdings zu Veränderungen des CF_1/Chl-Verhältnisses. Nach Tab. 8 hat eine Erniedrigung der Lichtintensität eine Verminderung der CF_1-Menge bezogen auf Chlorophyll zur Folge.

	Lichtintensität bei der Anzucht	
	5000 Lux	14000 Lux
Mol CF_1/Mol Chl	1:1260	1:740
µMol ATP/mg Chl·h	702	1240

Tab. 8: Einfluß der Lichtintensität bei der Anzucht auf das CF_1/Chl-Verhältnis und die Photophosphorylierungs-Kapazität isolierter Thylakoide. Bestimmung des CF_1/Chl-Verhältnisses durch EID (Eichung mit CF_1-Präp. 72, Spinat; AS: anti-CF_1 Spinat, 25µl 152-t/10ml Gel; Elektrophorese: 18h, 80V, 15°C). Photophosphorylierung unter lichtsättigenden Bedingungen (24), siehe Methodenteil.

Die gleichzeitige Abnahme der Photophosphorylierungs-Kapazität kann somit durch den erniedrigten CF_1-Gehalt der Thylakoide erklärt werden (28), der demnach der limitierende Faktor der ATP-Synthese unter den angegebenen Versuchsbedingungen ist. Aufgrund dieser Tatsache läßt sich aus den in Tab. 8 angegebenen Werten die maximale Umsatzgeschwindigkeit eines ATP-Synthase-Komplexes berechnen. Sie beträgt in Übereinstimmung mit veröffentlichten Werten (199) <u>4ms/ATP</u>.

1.8. Diskussion der Methode

In dieser Zwischendiskussion soll die neue Immunmethode zur Bestimmung von CF_1 besprochen werden, die mit ihr erzielten Ergebnisse zur CF_1/Chl-Stöchiometrie in Thylakoiden sollen der Hauptdiskussion vorbehalten bleiben. Wie schon in der Einleitung zu diesem Kapitel erwähnt, sind die bisher veröffentlichten, enzymatischen CF_1-Bestimmungen für meine Untersuchungen nicht geeignet. Die Gründe hierfür habe ich dargelegt (S. 8). Folgende Eigenschaften (Vorteile) der neuen Immunmethode sind zu nennen:

1. Der geringe Arbeitsaufwand und die daraus resultierende
2. Möglichkeit zur Bewältigung größerer Probenzahlen (50 Proben sind keine Schwierigkeit; nach der Methode von VAMBUTAS & RACKER (189) bereiten schon 3 Parallelproben große Mühe).
3. Die hohe Empfindlichkeit: Noch 4 µg CF_1/ml (Probenvolumen 6µl) sind quantifizierbar. Die Immunmethode ist also 30x bzw. 140x empfindlicher als die ATPase-Bestimmungen durch Trypsin- (189) bzw. Hitze-Aktivierung (57).
4. Kleines Probenvolumen: 6µl.
5. Die hohe Spezifität.
6. Unabhängigkeit von Reinheit und Aktivität des Enzyms.
7. Die direkte Vergleichbarkeit von freiem und membrangebundenem CF_1 und damit:
8. Die Möglichkeit einer Absolutbestimmung von freiem und membrangebundenem CF_1 durch Eichung mit gereinigtem CF_1 (die Aktivitätsbestimmungen (57,189) zeigen nur relative Unterschiede).

Voraussetzungen zur Durchführung einer EID sind ein monospezifisches Antiserum und für Absolutbestimmungen ein gereinigtes Protein (CF_1) zur Eichung.

Bei der Auflösung von Thylakoiden in Triton wird der komplette CF_0-CF_1-Komplex solubilisiert. Eine Dissoziation des Komplexes scheint unter diesen Bedingungen nicht stattzufinden. Setzt man nämlich suboptimale Tritonkonzentrationen zur Auflösung der Thylakoide ein (Tab. 2, Zeile 6), so erhält

man nach Zentrifugation (2min, EPPENDORF-Mikrozentrifuge) ein grünes Sediment. Ein Teil der Membranen bleibt also ungelöst, wobei der gelöste Chlorophyll-Anteil mit der Menge des solubilisierten CF_0-CF_1-Komplexes korreliert (Tab. 2, Spalte 3 und 4). Wie Abb. 6 zeigt, wird durch ein Antiserum gegen CF_1 aus einer solchen Triton-Membran-Lösung der gesamte CF_0-CF_1-Komplex präzipitiert. Dies trifft somit wohl auch für die Präzipitation während einer Rocketimmunelektrophorese zu. Trotzdem sind membrangebundener CF_1 (=CF_0-CF_1) und freier CF_1 in ihren Rocketlängen direkt vergleichbar (Tab. 4). Die hierzu notwendige immunologische Identität von CF_1 und CF_0-CF_1 gegenüber den verwendeten Antiseren zeigt die Abb. 8.

Nach Etablierung der Immunmethode in unserem Labor (27, 147) erschien eine Arbeit von FRASCH et al. (60), die sich mit der Absolutbestimmung von thylakoidgebundenem CF_1 durch EID befaßt. Zur Solubilisierung des gebundenen CF_1 wurden die Thylakoide mit Chloroform extrahiert. Diese Methode ist aber weder für Absolut- noch für Relativbestimmungen geeignet, da - wie die Autoren auch selber schreiben - die bestimmte CF_1-Menge von der Effektivität der Extraktion abhängt. In der Tat bewirkt eine Chloroform-Extraktion (204) keine komplette Ablösung des CF_1 von der Membran, wie eigene Versuche bestätigt haben (Daten nicht gezeigt). Angemerkt sei noch, daß FRASCH et al. (60) die Identität des zur Eichung benutzten, pyrophosphat-extrahierten CF_1 mit dem $CHCl_3$-extrahierten gegen das verwendete Antiserum nicht gezeigt haben.

Das zweite von FRASCH et al. (60) vorgestellte Verfahren zur Bestimmung von CF_1 in Membranfraktionen ist mit der Methode von STROTMANN et al. (178) weitgehend identisch. Hiernach werden Thylakoide nach Pyrophosphatbehandlung (Kap. VI. 5.2.) mehrfach mit Puffern niedriger Ionenstärke extrahiert. Der bei jedem Extraktionsschritt in Lösung gehende CF_1 wird bei STROTMANN et al. (178) durch Messung der ATPase-Aktivität (189), bei FRASCH et al. (60) durch Elektroimmunodiffusion bestimmt. Zur kompletten CF_1-Extraktion sind drei M^{2+}-komplexierende Schritte mit $Na_4P_2O_7$ und ca. 5 Extraktionsschritte notwendig (60), ein Verfahren, das für größere Probenzahlen und kleine Probenvolumina nicht geeignet ist, u.a.

steigert es die Anzahl der Analysenproben um den Faktor 5. Somit bleibt die in dieser Arbeit vorgestellte Methode zur Bestimmung von freiem und membrangebundenem CF_1 bei weitem die einfachste und für meine Untersuchungen geeignetste.

2. Untersuchung der CF_0-CF_1-Bindung und -Dissoziation mit Hilfe der Elektroimmunodiffusion

Als peripheres Membranprotein kann CF_1 leicht von den Thylakoiden abgelöst werden, so z.B. mit EDTA oder Pyrophosphat als M^{2+}-komplexierende Substanzen (9,178). Der Effekt der Komplexbildner auf die CF_1-Ablösung und die damit einhergehende Erniedrigung der Photophosphorylierungs-Kapazität der Thylakoide kann durch die verschiedensten Kationen kompensiert werden (24,26,74,77,146,182). Eine quantitative Abhängigkeit der CF_0-CF_1-Dissoziation vom Einfluß verschiedener Kationen wurde bisher nicht untersucht. In diese Richtung gehende Versuche von TELFER et al. (182) lassen, wie schon begründet (S. 3), aus methodischen Gründen nur halbquantitative Aussagen zu, da als Maß für membrangebundenen CF_1 die Photophosphorylierungs-Kapazität der Thylakoide gewertet wurde. In der vorliegenden Arbeit sollen sowohl die Dissoziation als auch die Rückbindung von CF_1 an EDTA-behandelte Thylakoide untersucht werden, um die chemische Natur der CF_0-CF_1-Bindung näher zu charakterisieren.

2.1. Abhängigkeit der CF_0-CF_1-Dissoziation vom pH-Wert bei der EDTA-Behandlung von Thylakoiden

Die Effektivität der CF_1-Dissoziation von der Thylakoidmembran durch EDTA ist vom Ionenmilieu abhängig. Bisher wurde nicht untersucht, welchen Einfluß der pH-Wert auf die CF_1-Ablösung hat. Vielleicht läßt sie sich durch eine Erhöhung der Protonen-Konzentration verhindern. Ist also die CF_0-CF_1-Bindung pH-abhängig? Wie aus Abb. 9 hervorgeht, wird durch EDTA unterhalb von pH 6,6 tatsächlich keine CF_1-Dissoziation mehr bewirkt. Die schon von SCHOPF (157) in anderem Zusammenhang diskutierte Möglichkeit, daß die Komplexierungsfähigkeit der

EDTA bei erniedrigtem pH-Wert vermindert sei, ist nicht für die beobachtete pH-Abhängigkeit verantwortlich. Dies geht einerseits aus Arbeiten zur EDTA-Chemie hervor (109,159), wie schon von mir eingehend diskutiert (146). Andererseits sprechen auch die Ergebnisse der folgenden Versuche gegen eine solche Hypothese.

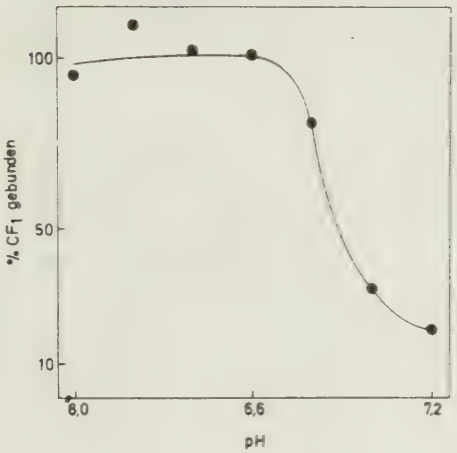


Abb. 9: Abhängigkeit der CF_1-Dissoziation von der Membran vom pH-Wert bei der EDTA-Behandlung. Thylakoidmembranen (0,1mg Chl/ml) werden bei verschiedenen pH-Werten wie beschrieben (Kap. VI.5.1.) mit EDTA behandelt. Die eingestellten pH-Werte werden ständig kontrolliert und ggf. nachgestellt. Nach Zentrifugation werden die Membranen in 100mM Saccharose, 20mM Tricin pH 7,8, 10mM NaCl suspendiert und auf 3% Triton gebracht. Diese "Membranlösungen" werden auf ihren Chlorophyll- und CF_1-Gehalt (EID) analysiert. Die Rocketlängen werden auf 10μg Chlorophyll standardisiert und die hierbei erhaltenen Werte prozentual auf den der unbehandelten Thylakoide bezogen (Kontrollpartikel). Rocketlänge der Kontrollpartikel: 43,2mm/10μg Chl. AS: anti-CF_1 (Spinat), 25μl 152-t/10ml Gel. Elektrophorese: 18h, 80V, 15°C.

2.2. pH-Abhängigkeit der CF_0-CF_1-Dissoziation nach M^{2+}-Komplexierung durch EDTA bei pH 6,0 bzw. 10mM $Na_4P_2O_7$

Eine Behandlung von Thylakoidmembranen mit EDTA bei pH 6 bzw. 10mM $Na_4P_2O_7$ bewirkt zwar eine Komplexierung zweiwertiger Metallionen, die CF_0-CF_1-Bindung wird aber durch den niedrigen pH-Wert bzw. die hohe Na^+-Konzentration stabilisiert. Zentrifugiert man nämlich die so behandelten Membranen ab und nimmt sie in Puffern niedriger Ionenstärke (<2mM) und unterschiedlichen pH-Werts wieder auf, so zeigt sich, daß die CF_0-CF_1-Bindung pH-empfindlich geworden ist (Abb. 10). Sie ist unterhalb von pH 6,6 stabil; eine maximale CF_1-Dis-

soziation findet bei pH 7,2 statt. Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, daß die CF_0-CF_1-Bindung in Abwesenheit zweiwertiger und geringer Konzentrationen einwertiger Kationen selbst pH-abhängig ist und schließt die von SCHOPF (157) diskutierte Möglichkeit aus. Der Unterschied in der gemessenen pH-Abhängigkeit nach EDTA- bzw. Pyrophosphatbehandlung von Thylakoiden (Abb. 10) mag auf unterschiedliche Konzentrationen an Kationen zurückzuführen sein. Die erhaltenen Partikel eröffnen die Möglichkeit, die CF_0-CF_1-Bindung in Abwesenheit zweiwertiger Kationen und des verwendeten Komplexbildners zu studieren.

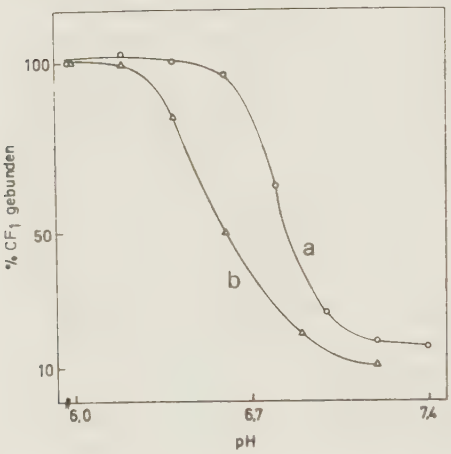


Abb. 10: Abhängigkeit der CF_0-CF_1-Dissoziation vom pH nach M^{2+}-Komplexierung durch EDTA bei pH 6 bzw. 10mM $Na_4P_2O_7$.
a. EDTA-Behandlung bei pH 6,0: Thylakoidmembranen werden wie beschrieben (Kap. VI.5.1.) mit EDTA bei pH 6,0 behandelt, zentrifugiert und das Sediment mit 1mM MES-Puffer pH 6,0 auf ca. 1mg Chl/ml gebracht. Mehrere Ansätze werden mit dem gleichen Puffer auf 0,1mg Chl/ml verdünnt und mit NaOH auf die angegebenen pH-Werte titriert (der pH ist ständig nachzustellen). Nach 12min Inkubation bei RT werden alle Ansätze 5min bei 27000g (4°C) zentrifugiert, die Sedimente mit 100mM Saccharose, 20mM Tricin pH 7,8, 10mM NaCl auf ca. 1mg Chl/ml eingestellt und auf 3% Triton gebracht (Stammlösung: 9%). Die so erhaltenen "Membranlösungen" werden auf ihren Chlorophyll- und CF_1-Gehalt (EID) analysiert und die CF_1-Rocketlängen auf 10µg Chlorophyll standardisiert. Als 100%-Wert für die Rockets gilt der Wert der bei pH 6,0 behandelten Probe (49mm Rocket/10µg Chl). AS: anti-CF_1 (Spinat), 25µl 152-t/10ml Gel. Elektrophorese: 18h, 80V, 15°C.
b. Pyrophosphatbehandlung von Thylakoiden (Kap. VI.5.2.): Nach Zentrifugation werden die Membranen wie unter a in MES-Puffer aufgenommen und weiterbehandelt. Analyse der "Membranlösungen" wie unter a. 100%-Wert: 44mm Rocket/10µg Chl (wie unter a).

2.3. Einfluß verschiedener Metallionen auf die CF_0-CF_1-Dissoziation bei pH 7,2 nach M^{2+}-Komplexierung durch EDTA bei pH 6,0

Wie Abb. 10 gezeigt hat, wird die CF_0-CF_1-Bindung nach EDTA-Behandlung bei pH 6 empfindlich gegenüber pH-Veränderungen. Bei pH 7,2 wird eine maximale CF_1-Dissoziation von ca. 80% erreicht. Läßt sich diese pH-Sensibilität der Bindung durch zugesetzte Metallionen wieder aufheben? Wie aus den Abb. 11 und 12 hervorgeht, können sowohl Na^+- als auch Mg^{2+}-Ionen die CF_1-Ablösung von der Membran bei pH 7,2 verhindern.

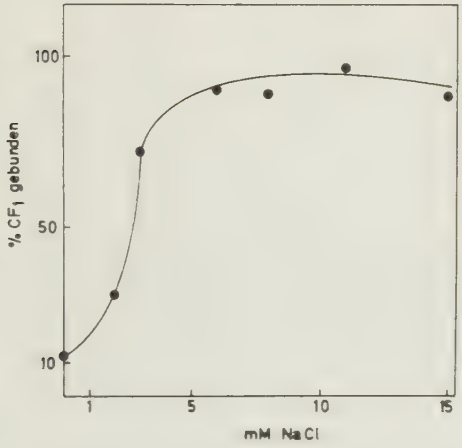


Abb. 11: Abhängigkeit der CF_0-CF_1-Dissoziation bei pH 7,2 von der NaCl-Konzentration nach EDTA-Behandlung bei pH 6,0. Es wird wie in Abb. 10 (a) verfahren, die Verdünnung der Membranen in MES-Puffer auf 0,1mg Chl/ml geschieht jedoch in Gegenwart der angegebenen NaCl-Konzentrationen. Danach werden alle Ansätze auf pH 7,2 titriert. Inkubation, Zentrifugation, Lösung der Thylakoide in Triton und EID wie in Abb. 10. 100%-Wert für die Rokketlängen: 53mm/10µg Chl (wie Abb. 10)

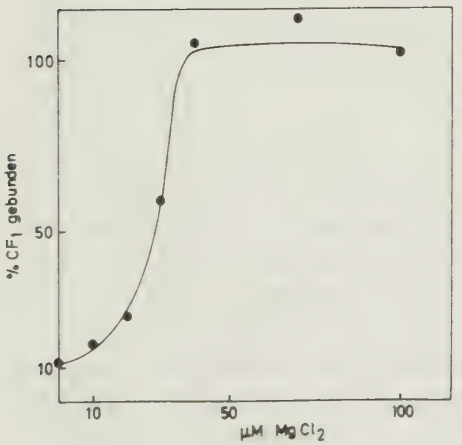


Abb. 12: Abhängigkeit der CF_0-CF_1-Dissoziation bei pH 7,2 von der $MgCl_2$-Konzentration nach EDTA-Behandlung bei pH 6,0. Wie Abb. 11, Inkubation jedoch in Gegenwart der angegebenen $MgCl_2$-Konzentrationen. 100%-Wert für die Rocketlängen: 45mm/10µg Chl (Probe wie in Abb. 10).

Somit ist also die EDTA-induzierte pH-Empfindlichkeit der CF_0-CF_1-Bindung reversibel. Die erforderlichen halbmaximal effektiven Ionenkonzentrationen an Na^+ bzw. Mg^{2+} unterscheiden sich allerdings um den Faktor 80 (Na^+: 2,5mM, Mg^{2+}: 0,03 mM). Andere zweiwertige Metallionen sind ähnlich wirksam wie Mg^{2+} (Tab. 9). Die Stabilisierung der CF_0-CF_1-Bindung zeigt also keine Spezifität für ein bestimmtes Kation.

Behandlung bei	mm Rocket/10 µg Chl	% membrangebundener CF_1
pH 6,0	54	100
pH 7,2	7	13
pH 7,2 + Mg^{2+}	29	54
pH 7,2 + Ca^{2+}	33	62
pH 7,2 + Sr^{2+}	32	58
pH 7,2 + Ba^{2+}	35	64
pH 7,2 + Ni^{2+}	42	77

Tab. 9: Einfluß verschiedener zweiwertiger Metallionen auf die CF_0-CF_1-Dissoziation bei pH 7,2 nach EDTA-Behandlung von Thylakoiden bei pH 6,0. Durchführung wie in Abb. 11 und 12. Die Ionen wurden in einer Konzentration von 30µM eingesetzt, der halbmaximal effektiven Konzentration für Mg^{2+}. In Spalte 1 sind die Inkubationsbedingungen für die bei pH 6,0 EDTA-behandelten Thylakoide angegeben (in 1mM MES-Puffer, 0,1mg Chl/ml). 100%-Wert (wie in Abb.10): siehe Tab. Zeile 1.

2.4. Bindung von CF_1 an EDTA-behandelte Thylakoidmembranen

In den vorangegangenen Abschnitten wurde der Effekt von EDTA auf die CF_0-CF_1-Dissoziation und seine Kompensierung durch verschiedene Kationen beschrieben. Im folgenden soll die Rückbindung von isoliertem CF_1 an EDTA-Partikel studiert werden. In Veröffentlichungen wurde der CF_1-Rückbindung bisher wenig Beachtung geschenkt. Das Interesse galt mehr der Rekonstitution der Photophosphorylierung von EDTA-Partikeln durch CF_1, zumal eine solche Rekonstitution die Bindung von CF_1 voraussetzt. So basieren die von TELFER et al. (182) veröffentlichten Bindungsstudien nur auf der Messung von Photophosphorylierungs-Aktivitäten, die keine quantitativen Aussagen über den rückgebundenen CF_1-Anteil zulassen. Mit der Immunmethode lassen sich folgende Fragen beantworten:

1. Welcher Anteil vom zugesetzten CF_1 wird an EDTA-behandelte Membranen zurückgebunden?
2. Zu welchem Prozentsatz werden freie Bindungsstellen auf den EDTA-Partikeln wieder durch CF_1 besetzt?

Die Rückbindung von isoliertem CF_1 an EDTA-Partikel unter optimalen Ionenbedingungen (10mM $MgCl_2$) zeigt, daß maximal der CF_1-Gehalt der Kontrollpartikel wieder erreicht werden kann (Tab. 10). Das Ausmaß der Rückbindung wird also durch die freien CF_0-Bindungsstellen limitiert, was gegen eine unspezifische Assoziation spricht. Eine komplette Besetzung der Bindungsstellen wird durch ca. 60µg CF_1/50µg Chl erzielt.

Probe	mm Rocket/10µg Chl	% membrangebund. CF_1
Kontroll-Partikel	36	100
EDTA-Partikel	12	33
EDTA-Partikel		
+ 9µg CF_1	21	58
+ 18µg CF_1	31	86
+ 36µg CF_1	34	95
+ 60µg CF_1	36,5	102
+ 72µg CF_1	37	103
+ 90µg CF_1	37	103

Tab. 10: Bindung von CF_1 an EDTA-behandelte Thylakoide in Abhängigkeit von der CF_1-Menge. Durchführung siehe Methoden Kap. VI.13. 0,5ml Ansatz enthalten: EDTA-Partkel (50µg Chl), CF_1 (Präp. 94, Spinat in 40mM Tricin pH 7,8, 2mM EDTA) in den angegebenen Mengen, 10mM $MgCl_2$. Quantifizierung des membrangebundenen CF_1 durch EID. AS: anti-CF_1 (Spinat), 30µl 150-4/10ml Gel. Elektrophorese: 18h, 120V, 15°C.

Nach den Ergebnissen aus Kap. III.1.7. enthalten die Thylakoidmembranen des hier benutzten Spinats ca. 25µg CF_1/50µg Chl. Berücksichtigt man, daß die verwendeten EDTA-Partikel noch 33% CF_1 bezogen auf Kontrollpartikel enthalten (Tab. 10, Zeile 2), so sind pro Ansatz für ca. 17µg CF_1 freie Bindungsstellen vorhanden. Zur Absättigung der EDTA-Partikel mit CF_1 ist also ein CF_1-Überschuß notwendig. Trotz theoretisch ausreichender oder sogar im Überschuß eingesetzter CF_1-Mengen (Tab. 10, Zeilen 4 und 5) können Bindungsstellen auf den Thy-

lakoiden unbesetzt bleiben, ein Teil des zugesetzten CF_1 bleibt also ungebunden. Er kann nach Zentrifugation im Überstand nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Diese Befunde konnten in vielen Versuchen bestätigt werden.

Zur Erzielung einer optimal rekonstituierten Photophosphorylierung in EDTA-Partikeln sind entsprechende CF_1-Überschüsse erforderlich, was auch die in verschiedenen Veröffentlichungen zur Rekonstitution eingesetzten CF_1/Chlorophyll-Verhältnisse implizieren, z.B. 50µg CF_1/15µg Chl (129) oder 3mg CF_1/1mg Chl (157). Trotz kompletter Besetzung aller Bindungsstellen in EDTA-Partikel mit CF_1 konnte ich die Photophosphorylierung immer nur zu einem kleinen Prozentsatz im Vergleich zu Kontroll-Partikeln rekonstituieren (sie ging prozentual nie über den prozentualen CF_1-Gehalt der verwendeten EDTA-Partikel hinaus)(Daten nicht gezeigt). Dieses Problem wurde zunächst nicht weiter verfolgt.

Die Rückbindung von CF_1 an EDTA-behandelte Thylakoide ist vom Ionenmilieu abhängig. Eine Stabilisierung der Bindung gelingt sowohl mit ein- als auch mit zweiwertigen Kationen (Abb. 13 und 14), wobei wie zur Kompensierung des EDTA-Effekts auf die CF_1-Ablösung von Thylakoiden (Abb. 11 und 12) die wirksame Konzentration bei einwertigen Kationen höher liegt als bei zweiwertigen. Außerdem fordert aber die Rückbindung

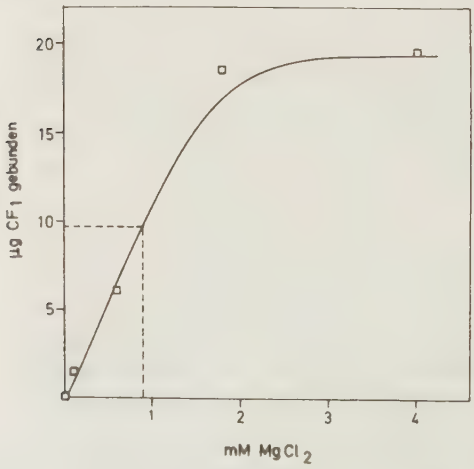


Abb. 13: Bindung von CF_1 an EDTA-behandelte Thylakoide in Abhängigkeit von der $MgCl_2$-Konzentration. Durchführung siehe Kap. VI.13. 0,5ml Ansatz enthalten: EDTA-Partikel (50 µg Chl), 50µg CF_1 (Präp. 91, Spinat) und $MgCl_2$ in den angegebenen Konzentrationen. Lösung der Membranen in 35µl 4,5% Triton, 1,2% DOC. CF_1-Analyse, EID: AS: anti-CF_1 (Spinat), 25 µl 152-t/10ml Gel. Elektrophorese: 18h, 80V, 15°C. Aufgetragen ist die Menge des an EDTA-Partikel rückgebundenen CF_1/50µg Chl. Gestrichelt: Ermittlung der halbmaximal wirksamen Konzentration. mm CF_1-Rocket/10µg Chl: 50,0 (Kontroll-Partikel), 11,2 (EDTA-Partikel ≙ 22% CF_1-Restgehalt).

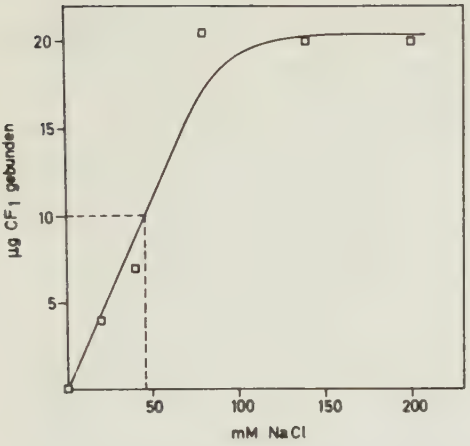


Abb. 14: Bindung von CF_1 an EDTA-behandelte Thylakoide in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration. Wie Abb. 13, aber mit den angegebenen NaCl-Konzentrationen in den einzelnen Ansätzen. Die Membranen wurden in 35µl 3% Triton gelöst. AS und Elektrophorese wie Abb. 13. mm CF_1-Rocket/10µg Chl: 55,6 (unbehandelte Thylakoide), 11,8 (EDTA-Partikel, ≙ 21% CF_1-Restgehalt).

von CF_1 an EDTA-Partikel insgesamt höhere Kationenkonzentrationen als sie zur Verhinderung des EDTA-Effekts notwendig sind (Tab. 11):

	Halbmaximal effektive Konzentration an		$[Na^+]/[Mg^{2+}]$
	Mg^{2+}	Na^+	
zur Kompensierung des EDTA-Effekts	30µM	2,5mM	~80
zur CF_1-Bindung an EDTA-Partikel	900µM	40mM	~44

Tab. 11: Halbmaximal wirksame Konzentrationen von Mg^{2+} und Na^+ zur Verhinderung der CF_0-CF_1-Dissoziation durch EDTA bzw. zur CF_1-Rückbindung an EDTA-Partikel. Die Werte wurden aus den Abb. 11 - 14 ermittelt.

2.5. Diskussion der Ergebnisse aus Kapitel 2

Der CF_1-ablösende Effekt M^{2+}-komplexierender Substanzen kann durch die Anwesenheit von Kationen kompensiert werden (Abb. 11, 12) (24,74,146). Eine Spezifität für ein bestimmtes Metallion liegt nicht vor (Tab. 9). Selbst H^+-Ionen stellten sich als effektiv heraus (Abb. 9). Eine bei pH 6,0 durchgeführte EDTA-Behandlung von Thylakoiden liefert Membranen, die zwar keinen CF_1-Verlust aufweisen, deren CF_0-CF_1-Bindung jedoch pH-sensitiv geworden ist (Abb. 10). Die induzierte pH-

Empfindlichkeit der CF_0-CF_1-Bindung nach EDTA-Behandlung bei pH 6,0 spricht für die Komplexierung zweiwertiger Metallionen unter diesen Bedingungen, schließt also die von SCHOPF (157) diskutierte Möglichkeit einer drastisch eingeschränkten Komplexierungsfähigkeit der EDTA bei pH 6 aus (siehe auch 146).

BRAGG & HOU (37) haben bei Escherichia coli gefunden, daß die durch EDTA bewirkte Ablösung des Kopplungsfaktors von der Membran durch Proteaseinhibitoren verhindert werden kann. Hieraus und aus der Tatsache, daß der in Abwesenheit der Inhibitoren isolierte F_1 eine etwas kleinere δ-Untereinheit aufweist als in deren Gegenwart isolierter (SDS-PAGE), schlossen sie, daß der Ablösung des Kopplungsfaktors eine Proteolyse der δ-Untereinheit vorausgehen muß. Dieser Schluß ist aber nicht zwingend. Unter Berücksichtigung meiner Ergebnisse kann die Beobachtung von BRAGG & HOU (37) leicht dadurch erklärt werden, daß mit 40mM ε-Aminocapronsäure (wahrscheinlich mit NaOH neutralisiert) und 6mM p-Aminobenzamidin-HCl als Proteaseinhibitoren genügend Kationen im Ablöseansatz vorhanden sind, um einen EDTA-Effekt auf die Dissoziation des Kopplungsfaktors von der Membran zu verhindern. Schon JAGENDORF & SMITH (77) haben gezeigt, daß Amine - wie Spermin- und Spermidin-HCl - die Wirkung von EDTA auf die Photophosphorylierungs-Kapazität von Thylakoiden aufheben können. Zwischen dem proteolytischen Abbau der δ-Untereinheit und der F_1-Dissoziation von der Membran muß also nicht unbedingt ein Zusammenhang bestehen.

Wie gezeigt sind sowohl ein- als auch mehrwertige Kationen in der Lage, die erzeugte pH-Sensitivität der CF_0-CF_1-Bindung - durch EDTA-Behandlung von Thylakoiden bei pH 6 - aufzuheben (Abb. 11,12). Ebenso wird eine Rückbindung von CF_1 an EDTA-Membranen durch die Anwesenheit ein- oder zweiwertiger Kationen ermöglicht. Welche Rückschlüsse lassen diese Ergebnisse auf die Natur der CF_0-CF_1-Bindung zu?

Die Stabilität der CF_0-CF_1-Bindung in Abwesenheit zweiwertiger Kationen (Abb. 10,11) zeigt, daß die früher diskutierten Magnesium-Brücken zwischen CF_0 und CF_1 (78) keine notwendige Voraussetzung für die Bindung sind, schließt aber ihr Vorkommen in vivo nicht aus. Nach BARBER (13) lassen sich die

beobachteten Phänomene - wie Fehlen einer Ionenspezifität und größere Effektivität höher geladener Kationen gegenüber weniger geladenen - durch die Theorie von GOUY-CHAPMAN erklären, indem die Kationen eine Abschirmung (screening) von negativen Oberflächenladungen bewirken und somit die Ladungsabstoßung zwischen CF_1 und der Membran (CF_0) erniedrigen. Der jeweils bei pH 4,7 liegende isoelektrische Punkt für CF_1 (115) bzw. die exponierten Thylakoidmembranen (4) sagt natürlich nichts über die Ladungsdichte an den Bindungsstellen der Membran bzw. des CF_1-Moleküls aus.

Aus der Tatsache, daß auch einwertige Kationen durch Verminderung der Oberflächenladungen zu einer Bindung von CF_1 an die Membran führen, kann der wesentliche Schluß gezogen werden, daß für die Bindung selbst nicht die Kationen sondern bisher nicht identifizierte Kräfte verantwortlich sind: Keine Abstoßung bedeutet noch keine Bindung (26,146). Zwischen CF_0 und CF_1 herrscht also ein Kräftespiel zwischen einer nicht identifizierten (spezifischen) Bindung und den Coulombschen Abstoßungskräften (Abb. 15), die in vivo wahrscheinlich durch Mg^{2+} - dem Hauptkation in der Ladungswolke an der äußeren Thylakoidmembran (123) - kompensiert werden.

Die Frage nach der Natur der eigentlichen Bindungskräfte kann zunächst nur spekulativ beantwortet werden. So führt LENAZ (96) Indizien für hydrophobe Interaktionen zwischen F_1 aus Mitochondrien und seinem Membranteil F_0 bzw. spezifischen "boundary"-Lipiden (81) an. Der Befund, daß CF_1 nicht an Proteolipid-komplementierte Lecithin- wohl aber Chloroplastenlipid-Vesikel bindet (51) spricht für eine spezifische Interaktion von CF_1 mit speziellen Lipiden der Thylakoidmembran. Die Dissoziation von CF_0-CF_1 durch Na-desoxycholat (Abb.30) deutet ebenfalls auf hydrophobe Wechselwirkungen zwischen CF_0 und CF_1 hin.

Die Versuche zur Rückbindung von CF_1 an EDTA-Partikel haben gezeigt, daß CF_1 eine spezifische Bindungsstelle auf der Membran besitzt, da selbst mit hohen CF_1-Überschüssen nur eine maximale Rückbindung von 100% bezogen auf Kontroll-Partikel erzielt werden kann (Tab. 10). Trotz dieser maximalen Rückbindung konnte die Photophosphorylierung nur zu einem geringen Prozentsatz rekonstituiert werden. In Verbindung mit

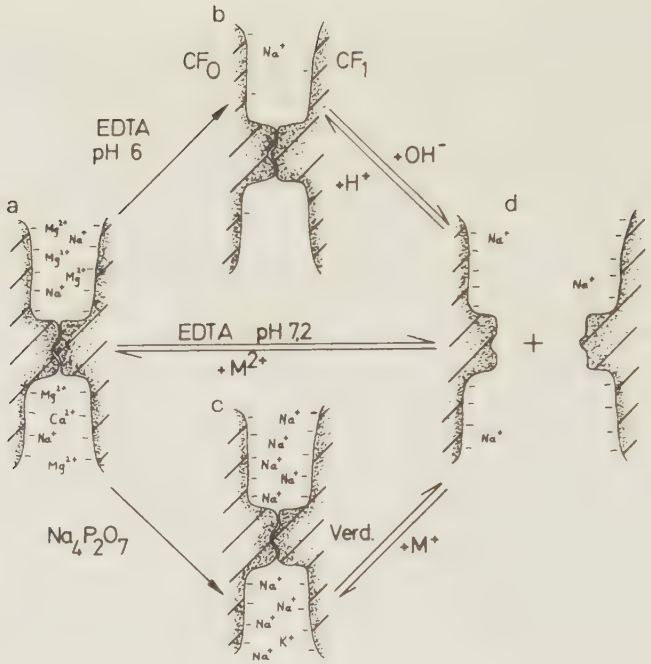


Abb. 15: Effekte von Komplexbildnern und Ionen auf die CF_0-CF_1-Bindung. Schematisch dargestellt sind 4 verschiedene Zustände (a - d) der CF_0-CF_1-Interaktion. Die mit negativen Ladungen besetzten Oberflächen der beiden Molekülteile stehen sich gegenüber. Die dargestellte Berührungszone zwischen CF_0 und CF_1 ist eine spezifische Bindungsstelle, die wahrscheinlich hydrophober Natur ist. a: Nativer Zustand (pH 7,2). b: Zustand nach EDTA-Behandlung bei pH 6. Die negativen Ladungen ($-COO^-$) sind durch Protonen weitgehend neutralisiert. Trotz Abwesenheit zweiwertiger Kationen erfolgt keine Dissoziation. c: Zustand nach Natriumpyrophosphat-Behandlung von Thylakoiden. Die zweiwertigen Ionen werden funktional durch einwertige (Na^+) ersetzt. Zur Dissoziation des Komplexes (Zustand d) führen verschiedene Wege. a→d: EDTA-Behandlung bei pH 7,2. b→d: Titration auf pH-Werte >7 nach EDTA-Behandlung bei pH 6. c→d: Verdünnen der Na^+-Ionen nach $Na_4P_2O_7$-Behandlung. Nicht eingezeichnet: Experimentell ist auch der Weg von b nach a (Abb. 12) und sicherlich auch der von c nach a gangbar. Abb. 11 (Aufhebung der pH-Sensitivität der CF_0-CF_1-Bindung durch Na^+) beinhaltet den Weg von a über b nach c.

den Ergebnissen, daß (a) zur Rückbindung von CF_1 ca. 20fach höhere Kationenkonzentrationen notwendig sind als zur Kompen-

sierung des EDTA-Effekts auf die CF_1-Ablösung (Tab. 11) und daß (b) zur maximalen Besetzung der Bindungsstellen in EDTA-Partikeln ein CF_1-Überschuß gebraucht wird, gelangt man zu der Vermutung, daß während der Isolierung von CF_1 oder der Herstellung der EDTA-Partikel bisher nicht bekannte, die Bindung und/oder Photophosphorylierung stimulierende Komponenten verloren gehen.

NELSON et al. (127) schließen aus einer Erhöhung der rekonstituierten Photophosphorylierung durch Digitonin, daß diese Substanz die Aggregation CF_1-verarmter Membranen (EDTA-Partikel) verhindert. In Abwesenheit von Digitonin soll diese Aggregation die Erreichbarkeit der Bindungsstellen für CF_1 auf den Thylakoiden erschweren und somit nur zu einer teilweisen Besetzung führen. Ein solches Argument wird durch die hier gefundene komplette Besetzung aller Bindungsstellen in Abwesenheit von Digitonin ausgeschlossen (Tab. 10).

3. Isolierung und Bestimmung von δ-freiem CF_1 und δ

Neben der chemischen Charakterisierung der CF_0-CF_1-Bindung stellt sich die Frage, welche der CF_1-Untereinheiten mit CF_0 interagieren und somit die Verbindung zur Membran herstellen. Nach Ergebnissen mit F_1 aus E. coli erfüllen die beiden kleinen Untereinheiten δ und ε die Aufgabe solcher Bindungsproteine (61,171,175). Für die Bindung von CF_1 an CF_0 scheint die δ-Untereinheit verantwortlich zu sein (204). Diese Ergebnisse sollten zunächst der Ausgangspunkt für meine Untersuchungen zur Funktion der δ-Untereinheit sein.

Methodisch sollte das Problem durch kombinierte Bindungs- und Rekonstitutionsversuche angegangen werden. Sollte sich eine quantitative Bestimmung von δ in Membranfraktionen durch EID als möglich erweisen, so wäre ohne großen Arbeitsaufwand eine gleichzeitige Bestimmung des CF_1- und δ-Gehalts sowie der Photophosphorylierungs-Kapazität von Thylakoidmembranen in vielen Ansätzen möglich. Zur Durchführung derartiger Versuche

sind die folgenden Vorausetzungen zu erfüllen:

a. Isolierung von δ-freiem CF_1 (Kap. 3.1.)
b. Isolierung von δ (Kap. 3.2.)
c. Herstellung und Charakterisierung eines Antiserums gegen δ (Kap. 3.3.)
d. Quantitative Bestimmung von freiem, membrangebundenem bzw. CF_1-gebundenem δ (Kap. 3.4.)

3.1. Isolierung und Bestimmung von δ-freiem CF_1

Bisher wurden zwei Methoden zur Isolierung von δ-freiem CF_1 beschrieben. (a) Durch einfache EDTA-Behandlung von Thylakoidmembranen aus Lactuca sativa var. romaine soll man direkt ein δ-freies Enzym (4-Untereinheiten-CF_1) erhalten (204). Diese Methode gelingt mit unserem einheimischen Salat nicht. (b) YOUNIS et al. (204) haben δ-freien CF_1 durch $CHCl_3$-Behandlung von Spinat-Thylakoiden und anschließende Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie des Extrakts erhalten (Kap. VI.7.). Solche CF_1-Präparationen lassen auf SDS-Gelen auf den ersten Blick die δ-Untereinheit vermissen (Abb. 16). Bei genauem Hinsehen kann man aber noch geringe δ-Spuren vermuten.

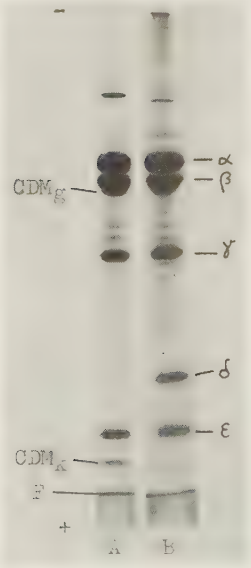


Abb. 16: Analyse von "δ-freiem" CF_1 durch SDS-Gelelektrophorese.
A. ca. 20μg "δ-freier" CF_1 nach YOUNIS et al. (204) (Präp. 20.7.81, Spinat).
B. ca. 20μg δ-haltiger CF_1 (Präp. 7.10. 80, Spinat).
CDM_g und CDM_k: Große bzw. kleine Untereinheit der Carboxydismutase. F: Front.

Mit Hilfe immunologischer Methoden und von Bindungsversuchen (Kap. 3.4.4. und 4.1.) konnte ich tatsächlich nachweisen, daß nach YOUNIS et al. hergestellte CF_1-Präparate noch δ enthalten. Die Restgehalte sind je nach Präparation verschieden und können 10 bis 40% δ im Vergleich zu membrangebundenem CF_1 betragen (Tab. 16). Unter Voraussetzung der Ergebnisse aus Kap. 4.1. läßt sich aus solchen δ-

verarmten Präparaten der δ-haltige CF_1 leicht abtrennen. Wie Abb. 17 und weitere Versuche aus Kap. 4 zeigen, wird nämlich der δ-haltige Anteil des Präparats bevorzugt an EDTA-Partikel gebunden. Bei einem geeigneten Verhältnis von δ-verarmtem CF_1 zu EDTA-Partikeln erhält man nach Zentrifugation einen Überstand mit δ-freiem CF_1 (Abb. 17, ab ca. 70µg Chl). Ein Überschuß an EDTA-Partikeln ist zu vermeiden, da sonst der gesamte CF_1 gebunden wird. Die δ-Freiheit eines so gewonnenen CF_1-Präparats geht auch aus Kap. 4.2.2. hervor.

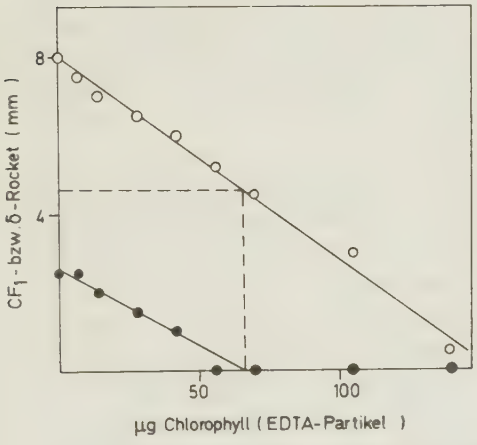


Abb. 17: Bindung von δ-verarmtem CF_1 an steigende Mengen EDTA-Partikel. 160µl Ansatz enthalten: 50µg δ-verarmten CF_1 (Präp. 14.1.81, Spinat) mit 40% δ-Restgehalt (siehe Tab. 16), 4mM $MgCl_2$, 25mM NaCl und EDTA-Partikel (31% CF_1-Restgehelt) in den angegebenen Mengen. Nach 15 min Inkubation bei RT und Zentrifugation werden die Überstände mit der EID auf CF_1 und δ analysiert (Kap. 3.4.). AS: anti-CF_1 (Spinat), 50µl 152-t/8,5ml Gel bzw. anti-δ (Spinat), 60µl 120-t/8,5ml Gel. Elektrophorese: 18h, 4V/cm, 15°C. Gestrichelte Linie: Ermittlung des ungebundenen CF_1-Anteils nach kompletter Erschöpfung von "δ" (= δ-haltiger CF_1) aus dem Überstand.

Das im Versuch (Abb. 17) verwendete CF_1-Präparat enthält ca. 40% δ im Vergleich zu membrangebundenem CF_1. Dieser Wert wurde durch eine gleichzeitige CF_1- und δ-Bestimmung des Präparats durch EID ermittelt (Tab. 16). Nach Abb. 17 gelangt man zu dem gleichen Ergebnis: Nach vollständiger Erschöpfung von "δ" (δ-haltiger CF_1) durch Bindung an EDTA-Partikel bleiben noch ca. 60% CF_1 ungebunden. Dieser Anteil ist somit δ-frei (δ-Rocket: 0mm). Unter der Annahme, daß δ-freier CF_1 durch die Membranen erst gebunden wird nachdem der gesamte δ-haltige "verbraucht" ist, beträgt der δ-Anteil des Präparats somit auch 40%.

Die Bestimmung von δ-freiem CF_1 erfolgt mit Hilfe der

Elektroimmunodiffusion. Bei Verwendung dieser Methode können δ-freier und δ-haltiger CF_1 quantitativ direkt miteinander verglichen werden, da die gleiche Anzahl von Molen eine annähernd identische Rocketlänge ergibt (Tab. 12):

Probe	pMole CF_1	mm CF_1-Rocket
4µg δ-haltiger CF_1	12,3	24,5
3,6µg δ-freier CF_1	12,6	22,5

Tab. 12: Vergleich von δ-haltigem und δ-freiem CF_1 in der EID. AG: δ-haltiger CF_1 (Präp. 91, Spinat) und δ-freier CF_1 (Präp. 12.11.80, Spinat) in 23mM Tricin pH 7,8, 0,7mM EDTA, 3% Triton, 0,8% DOC. AS: anti-CF_1 (Spinat), 25µl 152-t/10ml Gel. Elektrophorese: 18h, 80V, 15°C. Molekulargewichte: 325000 (δ-haltiger CF_1) und 285000 (δ-freier CF_1).

Im Ouchterlony-Test erweist sich Chloroform-extrahierter CF_1 als immunologisch identisch mit EDTA-extrahiertem CF_1 in Rohextrakten und gereinigter Form sowie mit tritongelöstem CF_0-CF_1-Komplex (Abb. 18,19). Durch Aufbewahrung bei -20°C erfährt der ungefällte, $CHCl_3$-extrahierte CF_1 eine solche Veränderung, daß er schon nach 2 Tagen im Ouchterlony keine Reaktion mehr mit dem verwendeten Antiserum zeigt (Abb. 19). Die gleiche Beobachtung konnte mit $CHCl_3$-extrahiertem CF_1 aus Salat gemacht werden (siehe auch Kap. 4.5.3.).

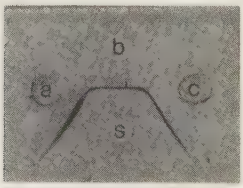


Abb. 18: Ouchterlony-Test mit Chloroform und EDTA-extrahiertem CF_1.
AG (je 6µl), a: EDTA-Extrakt von Spinat-Thylakoiden (13,5-fach konzentriert).
b: Wässriger Überstand nach Chloroform-Extraktion von Thylakoiden (Spinat).
c: Gereinigter, EDTA-extrahierter CF_1 (Präp. 97A, Spinat, 1,1mg/ml).
AS (6µl), s: anti-CF_1 (Spinat), 152-t.

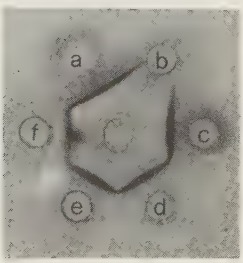


Abb. 19: Ouchterlony-Test mit tritongelösten Spinat-Thylakoiden und bei verschiedenen Bedingungen aufbewahrtem Chloroform-extrahiertem CF_1.
AG (je 6µl), a: 2 Tage bei 4°C aufbewahrter, wässriger Überstand nach Chloroformextraktion von Spinat-Thylakoiden.
b: Wie a bei -20°C aufbewahrt.
c: Ammoniumsulfat-Fällung (50%) eines

wässrigen Überstands nach Chloroform-Extraktion von Thylakoiden in 40mM Tricin pH 7,8, 2mM EDTA.
d: Wie c, aber Säurefällung (siehe Kap. VI.10)
e: Detergenzgelöste Spinat-Thylakoide (0,65mg Chl/ml in 3% Triton, 0,8% Na-desoxycholat)
f: wie e, aber 24h alt.
AS: Wie Abb. 18 (zentrales Loch).

3.2. Isolierung von δ aus Spinat-CF_1

Ziel war es, δ aus CF_1 in biologisch aktiver Form zu isolieren. NELSON & KARNY (129) und YOUNIS et al. (204) haben dies mit einer fast identischen Methode erreicht, so daß an ihre Ergebnisse angeknüpft werden soll. Ausgeschlossen wurde die Methode von BINDER et al. (29), da sie während sämtlicher Arbeitsschritte SDS als denaturierendes Detergenz verwendeten. Die Ergebnisse der veröffentlichten Methoden zur δ-Isolierung (129,204) ließen sich schlecht reproduzieren, wie auch schon BONNEKAMP (32) berichtet. Auf die Schwierigkeiten wird noch im einzelnen eingegangen. Gereinigtes δ soll zum einen für Bindungs- und Rekonstitutionsversuche (Kap. 4) zum anderen zur Herstellung eines Antiserums gegen δ isoliert werden (Kap. 3.3.)

3.2.1. Kombination der Methoden von NELSON & KARNY (129) und YOUNIS et al. (204) zur δ-Isolierung aus CF_1

Beiden genannten Methoden ist der CF_1-dissoziierende Schritt mit Pyridin gemeinsam. Hierzu wird eine CF_1-Lösung mit ca. 2mg Protein/ml mit dem gleichen Volumen Pyridin unter kräftigem Rühren vermischt und 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Lösung 1:2,5 mit Wasser verdünnt und 1h bei 4°C gerührt. Eine hierbei auftretende Trübung wird abzentrifugiert (10min, 12000g, 4°C) und der Überstand auf verschiedene Weise weiterverarbeitet.

Nach YOUNIS et al. (204) soll aus diesem Überstand durch 50% Äthanol ein δ,ε-angereichertes Präzipitat gefällt werden. In mehreren voneinander unabhängigen Versuchen erhielt ich auf diese Weise entweder kein oder nur sehr wenig Präzipitat, das wie bei BONNEKAMP (32) keine Anreicherung an irgendwelchen Untereinheiten erkennen ließ (nicht gezeigt). Zur Fraktionierung sollte deshalb die von NELSON & KARNY (129) be-

schriebene Alternativmethode durchgeführt werden. Hierzu wird der oben genannte Überstand im Rotationsverdampfer bis zur Bildung einer starken Trübung eingeengt. Das ausgefallene Protein (Fraktion SP1), das vornehmlich aus α, β, und γ besteht (Abb. 20) wird abzentrifugiert (10min, 12000g, 4°C) und der Überstand im Rotationsverdampfer bis fast zur Trokkenheit eingeengt. Der Rückstand (Fraktion SP2) wird mit wenig Wasser gewaschen und in 7 M Harnstoff, 20mM Tricin pH 8 gelöst. Diese Lösung ist in δ und ε angereichert (Abb. 20). Eine weitere Auftrennung der Untereinheiten erfolgt sowohl bei YOUNIS et al. als auch bei NELSON & KARNY durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose. Die nach NELSON & KARNY (129) beschriebene Stufenelution ergibt keine Trennung der Untereinheiten, da bereits mit dem Puffer niedrigster Ionenstärke (0,5 M NaCl) alle Untereinheiten eluiert werden. Hierzu erwiesen sich wieder die Angaben von YOUNIS et al. als brauchbar: Die mit 7 M Harnstoff, 20mM Tricin pH 8 äquilibrierte DEAE-Cellulose-Säule (ø 1cm, Höhe 6cm) wird nach Auftragen der Probe zunächst mit Äquilibrierungs-Puffer gewaschen (siehe auch Abb. 21). Die Elution erfolgt in Stufen mit dem gleichen Puffer, der zusätzlich 25, 100 bzw. 200mM NaCl enthält. Schon beim Waschen mit Äquilibrierungspuffer wird ε eluiert (siehe Kap. 4.5.1.). Mit der ersten Stufe, die ich auf 40 mM NaCl erhöht habe, erscheinen α und β. Bei NaCl-Konzentrationen >100mM wird δ eluiert, begleitet von einem zweiten α,β-Peak (Abb. 21). Die γ-Untereinheit ist in der aufgetragenen Probe (SP2) schon so weit abgereichert (Abb. 20), daß sie nach der Ionenaustauschchromatographie durch SDS-Gelanalyse nicht mehr wiedergefunden wird.

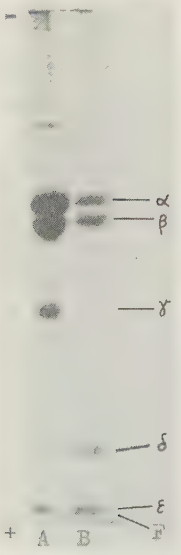


Abb. 20: SDS-Gelanalyse der Fraktionen SP1 und SP2 (siehe Text). Ausgangsmaterial: 40 mg Spinat-CF_1. A. SP1 (Gesamtvol. 2,6ml), Analysenvol. 10µl inkl. Proteinlösungsgemisch. B. SP2 (Gesamtvol. 1ml), Analysenvol. 25µl inkl. Proteinlösungsgemisch. Gel: 11% Acrylamid. F: Front.

Die SDS-Gelanalyse zeigt, daß durch die Einengung im Rotationsverdampfer eine δ,ε-angereicherte Fraktion (SP2) erhalten wird, die allerdings noch große Anteile an α und β aufweist (Abb. 20). Durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose läßt sich eine Abtrennung von ε und weitere Anreicherung von δ gegenüber α und β erzielen (Fraktionen A der Abb. 21 und 22). Aber auch nach diesem Reinigungsschritt ist der Anteil der großen Untereinheiten immer noch beträchtlich. Die so erhaltene δ-Fraktion ist in ihrer Untereinheitenzusammensetzung der von YOUNIS et al. (204) dargestellten sehr ähnlich. Sie wurde in dieser Form von den genannten Autoren für Rekonstitutionsversuche verwendet.

Mit Hilfe der EID wurden die relativen δ-Gehalte der bei der Isolierung anfallenden Fraktionen bestimmt (Tab. 13):

Fraktion (Verdünnung)	Fraktionsvolumen (ml)	δ-Rocketlänge (mm)	Relative δ-Menge mm•ml	%
CF_1 (1:4)	20	13	1040	100
SP1 (1:20)	2,6	7	364	35
SP2 (1:5)	1,0	17,5	88	8,5
δ-Fraktion	9,8	6,2	60	5,8

Tab. 13: Bestimmung des relativen δ-Gehalts der bei der δ-Isolierung anfallenden Fraktionen durch EID mit anti-δ. Unter identischen Bedingungen wurde mit den verschiedenen Fraktionen (in geeigneter Verdünnung) eine EID mit anti-δ durchgeführt. Die erhaltenen Rocketlängen multipliziert mit dem Gesamtvolumen der entsprechenden Fraktionen (Verdünnung berücksichtigen) stellen ein relatives Maß für die enthaltende δ-Menge dar (Spalte 4). Der δ-Gehalt des Ausgangsmaterials wurde 100% gesetzt. δ-Fraktion: Nach Ionenaustauschchromatographie von SP2 vereinigte δ-haltige Fraktionen. AS: anti-δ (Spinat), 80µl 120-t/10ml Gel. Elektrophorese: 4h, 300V, 15°C.

Die Ergebnisse der Tab. 13 machen folgendes deutlich:

a. Die nach Pyridinbehandlung und Eindampfschritt in 7 M Harnstoff, 20mM Tricin pH 8 löslichen Anteile der Fraktionen SP1 und SP2 enthalten zusammen nur ca. 44% vom eingesetzten δ, was einem Verlust von über 50% entspricht.

b. Die Ausgangsfraktion für die weitere δ-Reinigung (SP2) weist nur 1/4 des δ-Gehalts der Fraktion SP1 auf. Die nach NELSON & KARNY (129) durchgeführte Fraktionierung erweist sich somit als sehr unvorteilhaft.

c. Durch Ionenaustauschchromatographie über DEAE-Cellulose geht weiteres δ verloren (hier ca. 30%), so daß die Gesamtausbeute an δ mit der beschriebenen Isolierungsmethode in der Regel zwischen 4 und 6% lag.

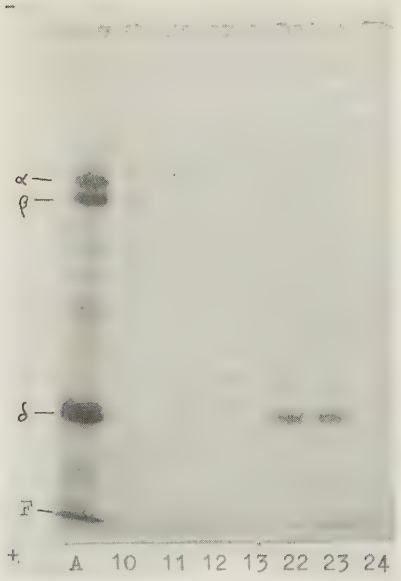


Abb. 21: SDS-Gelelektrophorese: Reinigung einer δ-Fraktion durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose in 7 M Harnstoff, 20mM Tricin pH 8. Probe: 16ml δ-Fraktion (wie Tab. 13), 1:10 verdünnt in 7 M Harnstoff, 20mM Tricin. Gelbett: ø 16mm, Höhe 32 mm. Elutionsgeschwindigkeit: 60 ml/h. Elutionspuffer: a. 20ml Äquilibrierungspuffer (7 M Harnstoff, 20mM Tricin pH 8). b. 45 ml wie a + 40mM NaCl. c. 50 ml wie a + 150mM NaCl. Nach 17ml Vorlauf wurden Fraktionen zu 3,4ml aufgefangen. A: δ-Fraktion, Probenvol 25µl. Säulenfraktionen: 10 - 13 (eluiert mit 40mM NaCl) und 22 - 24 (eluiert mit 150mM NaCl), Probenvol. je 25µl.

Eine weitere Reinigung der δ-Fraktion kann (a) durch eine zweite Ionenaustauschchromatographie (Abb. 21) oder (b) durch Gelfiltration über Sephacryl S200 (Abb. 22) erfolgen, wobei sich die Gelfiltraion aus den folgenden Gründen eindeutig als günstiger erweist:

1. Sie bewirkt eine komplette Abtrennung der α- und β-Untereinheit vom δ und liefert so ein homogenes δ-Präparat (nach SDS-PAGE).
2. Bei der Gelfiltration findet fast kein Verlust an δ statt. In der Regel werden zwischen 90 und 100% vom aufgetragenen δ wiedergefunden (nach Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose nur ca. 60%).

Die zusätzlich zu den beschriebenen Methoden durchgeführte Gelfiltration stellt also einen sehr effektiven Reinigungsschritt dar.

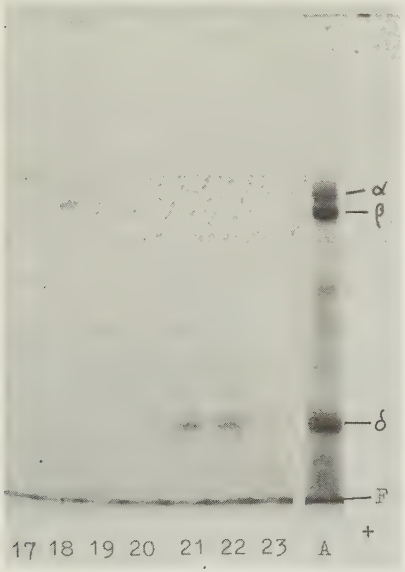


Abb. 22: SDS-Gelelektrophorese: Reinigung einer δ-Fraktion durch Gelfiltration über Sephacryl S 200 in 7 M Harnstoff, 20mM Tricin pH 8. Probe: 1,8ml δ-Fraktion (wie Tab. 13). Gelbett: ø 16mm, Höhe 80cm. Elutionsgeschwindigkeit: 11ml/h. Fraktionsvolumen: 3,4ml.
A: δ-Fraktion (Probenvol. 25µl).
17 - 23: Säulenfraktionen (Probenvol. 25µl).
F: Front.

3.2.2. Gelfiltration von pyridin-dissoziiertem CF_1

Die nach NELSON & KARNY (129) durchgeführte Fraktionierung von pyridin-dissoziertem CF_1 ist in bezug auf die δ-Ausbeute sehr ungünstig (Tab. 13, Abb. 20), da die Fraktion SP1 noch einen Großteil der δ-Untereinheit enthält. Eine Alternativmethode soll deshalb vorgestellt werden.

Nach Dissoziation von CF_1 in Pyridin wird das so erhaltene Untereinheiten-Gemisch im Rotationsverdampfer bis auf ein kleines Volumen eingeengt - der Eindampfschritt also nicht zur Fraktionierung verwendet. Das ausgefallene Protein wird abzentrifugiert (10min, 12000g, 4°C) und in 7 M Harnstoff, 20mM Tricin pH 8 gelöst. Die unlöslichen Bestandteile werden durch Zentrifugation abgetrennt. Die Auftrennung der Untereinheiten erfolgt durch Gelfiltration über Sephacryl S 200 (Abb. 23, 24). Nach diesem ersten Trennungsschritt erhält man Fraktionen, die vorwiegend aus δ-Untereinheit bestehen (Abb. 23). Die Ausbeute an δ beträgt 34% (bestimmt durch EID). Eine

weitere Reinigung kann wie unter 3.2.1. beschrieben vorgenommen werden, wobei durch eine zusätzliche Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose wiederum ein δ-Verlust von 40% auftritt. Die δ-Ausbeute würde dann bei 20% liegen. Eine zweite Gelfiltration ist somit der Ionenaustauschchromatographie vorzuziehen.

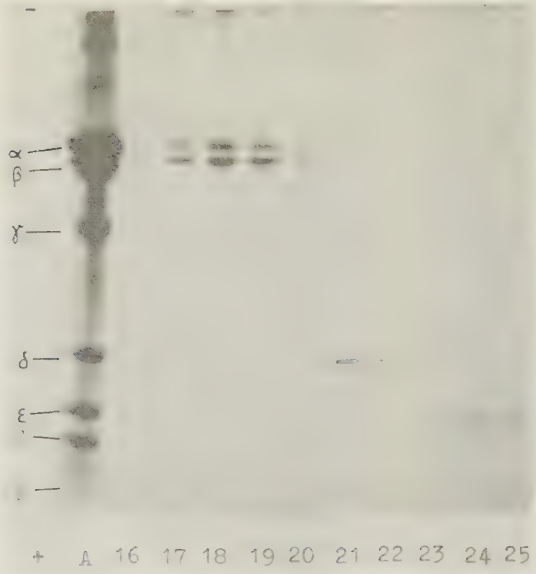


Abb. 23: SDS-Gelelektrophorese: Gelfiltration von pyridindissoziertem CF_1 über Sephacryl S 200. Probe: 1,8ml pyridindissoziierter CF_1 (18 mg, Präp. 4.5.81.) in 7 M Harnstoff, 20mM Tricin pH 8. Säule und Elution wie Abb. 22.
A: Pyridin-diss. CF_1.
16 - 25: Säulenfraktionen.
Probenvol. jeweils 25µl.
C: Kleine Untereinheit der Carboxydismutase. F: Front.

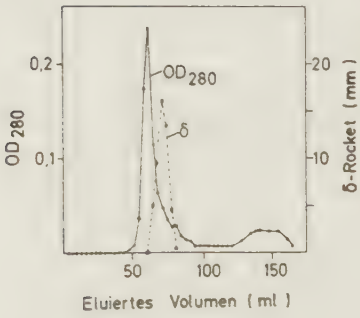


Abb. 24: Elutionsdiagramm der Gelfiltration aus Abb. 23. Eingezeichnet sind die OD_{280} (durchgezogene Linie) und der relative δ-Gehalt der Fraktionen (gestrichelte Linie). Er wurde durch EID bestimmt. AS: anti-δ (Spinat), 80µl 120-t/10ml Gel. Elektrophorese: 18h, 120V, 15°C.

3.3. Herstellung und Charakterisierung von Antiseren gegen die δ-Untereinheit aus Spinat-CF_1

Mit einem durch Pyridinbehandlung, Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration (Kap. 3.2.) isolierten δ wurden 2 Kaninchen immunisiert (siehe Methodenteil). Die erhaltenen Antiseren 167 und 168 sowie das von BONNEKAMP (32) hergestellte AS 120-t sollten näher charakterisiert und auf ihre Eignung für eine EID getestet werden. Im Ouchterlony bildeten alle Antiseren ein Präzipitat mit isoliertem δ; die Immunisierung war also positiv verlaufen (Abb. 25, 26) Mit CF_1 und in Detergenzien gelösten Thylakoiden wurde jeweils nur eine Präzipitationslinie erhalten (Abb. 27, 32).

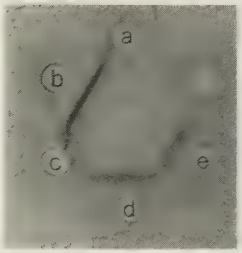


Abb. 25

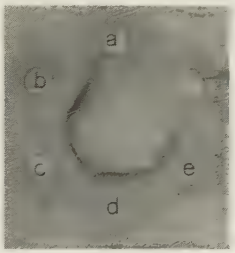


Abb. 26

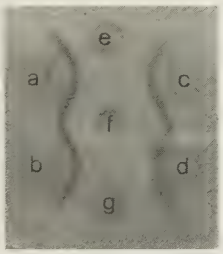


Abb. 27

Abb. 25: Reaktion der gewonnenen δ-Antiseren mit isoliertem δ im Ouchterlony-Test. a: Kontrollserum 167-0. b: AS 120-t. c: AS 167-3. d: AS 167-2. e: AS 167-1. Zentrales Loch: Isolierte δ-Untereinheit.

Abb. 26: Wie Abb. 25. a: Kontrollserum 168-0. b: AS 120-t. c: AS 168-1. d: AS 168-2. e: AS 168-3. Zentrales Loch: Isolierte δ-Untereinheit.

Abb. 27: Reaktion der gewonnenen δ-Antiseren mit gereinigtem CF_1 und detergenzgelösten Spinat-Thylakoiden im Ouchterlony-Test. a: AS 168-1. b: AS 168-2. c: AS 168-3. d: AS 167-1. e und g: Detergenzgelöste Thylakoide (1mg Chl/ml) in 3% Triton, 0,8% Na-desoxycholat. f: Gereinigter CF_1 (Präp. 91, Spinat, ca. 0,5mg/ml)

Wie das AS 120-t (146) zeigten auch die neuen AS 167 und 168 keine Reaktion mit δ-haltigem CF_1 aus Salat. In der im nächsten Abschnitt noch zu besprechenden EID bildeten alle δ-Antiseren mit δ-Rohfraktionen (wie CF_1, detergenzgelösten Thylakoiden oder pyridindissoziertem CF_1) nur eine Rocket aus

(nicht gezeigt). Die Antiseren sind also als monospezifisch für δ zu bezeichnen. Zu diesem Schluß kam auch BONNEKAMP (32) für das AS 120-t.

Die Präzipitationstiter der neuen AS 167 und 168 waren geringer als beim schon vorhandenen AS 120-t. Da Rocketlängen umgekehrt proportional dem Antikörpergehalt des Gels sind, (94), kann man durch EID die Präzipitationstiter einzelner Antiseren vergleichend bestimmen. Hierzu wurden mit verschiedenen Antigenen und allen vorhandenen δ-Antiseren Rockets erzeugt, ihre Längen gemessen und daraus die Präzipitationstiter bezogen auf das AS 120-t (100%) berechnet (Tab. 14).

δ-Antiserum	rel. Präzipitationstiter
120-t	100 %
168-1	48 %
168-2	50 %
168-3	43 %
167-1	19 %
167-2	19 %
167-3	17 %

Tab. 14: Relative Präzipitationstiter der gewonnenen Antiseren der Reihen 167 und 168 im Vergleich zum AS 120-t (siehe Text).

Die bestimmten Werte zeigen, daß sich die Präzipitationstiter der verschiedenen Zapfungen der AS 167 und 168 (1 - 3) kaum voneinander unterscheiden. Im Vergleich zum AS 120-t treten aber Unterschiede um den Faktor 2 (AS 168) bzw. 5 auf (AS 167). In der vorliegenden Arbeit wurden nur die AS 120-t und 168-3 für δ-Bestimmungen verwendet (die AS 168-1 und 168-2 besitzen zwar einen höheren Präzipitationstiter als das AS 168-3, sind aber von der Menge begrenzt).

3.4. Bestimmung von freiem, CF_1-gebundenem und membrangebundenem δ durch Elektroimmunodiffusion

Um die Funktion von δ in der photosynthetischen ATP-Synthase qualitativ und quantitativ untersuchen zu können, war eine Bestimmungsmethode für δ die Voraussetzung. Bei den bisher veröffentlichten Untersuchungen zur δ-Funktion konnte die Rekonstitution der Photophosphorylierung von EDTA-Partikeln durch δ und δ-freien CF_1 nur in Abhängigkeit von der zugesetzten δ-Menge angegeben werden. Eine quantitative Bestim-

mungsmethode für δ soll es ermöglichen, die tatsächlich aktiv gewordene (CF_1-gebundene) δ-Menge zu messen. Für ein enzymatisch nicht aktives Protein wie δ bot sich hierfür die Elektroimmunodiffusion an. Mit dem bereits vorhandenen Antiserum 120-t (herg. von G. BONNEKAMP, 32) und den von mir hergestellten AS 167 und 168 gegen δ wurde die Möglichkeit einer δ-Bestimmung durch EID untersucht. Ziel war es, δ sowohl in freier (siehe z.B. Abb. 24), CF_1-gebundener und membrangebundener Form, d.h. im CF_0-CF_1-Komplex, bestimmen zu können. Wie bei der EID mit CF_1 soll die Vergleichbarkeit der mit verschiedenen δ-Fraktionen erhaltenen Rockets und damit die Möglichkeit einer Absolutbestimmung von CF_1- und membrangebundenem δ durch Eichung mit gereinigtem δ untersucht werden.

3.4.1. Abhängigkeit der δ-Rocketlänge von der Antigenmenge

Isoliertes δ und δ-haltiger CF_1 ergaben ohne jede Schwierigkeit Rockets mit den δ-Antiseren. Die lineare Abhängigkeit der δ-Rocketlänge von der δ-Menge ist in Abb. 28 dargestellt.

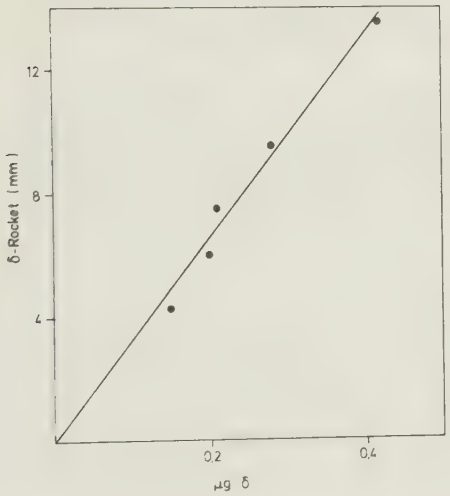


Abb. 28: EID mit isoliertem δ: Abhängigkeit der Rocketlänge von der δ-Menge. AG: Gereinigtes δ in den angegebenen Mengen. AS: 200µl 168-3/10 ml Gel. Elektrophorese: 18h, 120V, 15°C.

3.4.2. Behandlung von Thylakoidmembranen zur Erzeugung von δ-Rockets mit membrangebundenem δ.

Die zur CF_1-Bestimmung in Membranfraktionen angewandte Methode konnte nicht auf die δ-Bestimmung übertragen werden, da die in Triton gelösten Membranen mit anti-δ keine Rocketbildung ergaben, obwohl merkwürdigerweise im Ouchterlony-Test unter diesen Bedingungen ein Präzipitat gebildet wurde (Abb. 29)(Langsame Dissoziation des CF_0-CF_1-Komplexes?). Durch Zusatz von Na-desoxycholat konnten aber auch mit tritongelösten Thylakoiden δ-Rockets erhalten werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Dissoziation des CF_0-CF_1-Komplexes in Gegenwart von Na-desoxycholat: Die Abb. 30 zeigt, daß nach DOC-Einwirkung auf CF_0-CF_1 mit anti-CF_1 erhaltene Immunpräzipitate einen verminderten Gehalt an CF_0-Untereinheit I sowie δ und ε aufweisen.

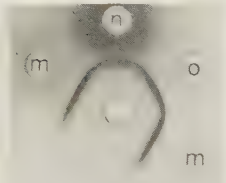


Abb. 29: Reaktion des δ-Antiserums 120-t mit CF_1 und tritongelösten Thylakoiden. m: CF_1 (Präp. 95, Spinat), 1mg/ml in 3% Triton. n: Thylakoide (1mg Chl/ml) in 3% Triton. o: EDTA-Extrakt von Spinat-Thylakoiden (31-fach konzentriert). Zentrales Loch: AS 120-t. Je 8µl AG und AS.

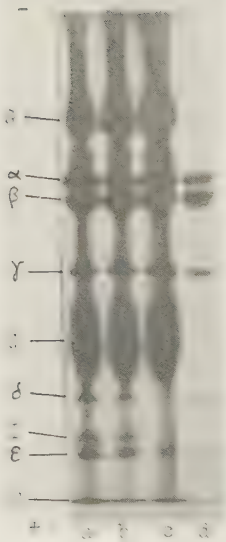


Abb. 30: Dissoziation des CF_0CF_1-Komplexes durch Na-desoxycholat. 0,5ml Thylakoidmembranen (1mg Chl/ml) in 10mM NaCl werden in 0,25ml 9% Triton gelöst. Nach Zentrifugation werden hiervon je 200µl Überstand mit 40µl (a) 3% Triton, (b) 3% Triton, 2,4% DOC und (c) 3% Triton, 4,8% DOC versetzt und 1,5h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgt die Präzipitation mit je 60µl anti-CF_1 (AS 152-t) 2h bei 4°C. Die gebildeten Präzipitate werden abzentrifugiert, 3 mal in ca. 1ml 5mM Tricin pH 8, 0,2% Triton gewaschen und in 60µl Proteinlösungsgemisch für die SDS-PAGE (Methoden) gelöst.
a - c: Präzipitate wie oben angegeben.
d: Isolierter CF_1 (Präp. 91, Spinat), 1,2 mg/ml. I: CF_0-Untereinheit vom Molekulargewicht 15500. G: γ-Globulin (siehe auch Abb. 6). F: Front.

Die Triton-Konzentration zur Auflösung der Thylakoide beträgt wie bei der CF_1-Bestimmung durch EID 3%. Kritisch ist die eingesetzte DOC-Konzentration. Bei zu niedrigen Konzentrationen (0,4%) entstehen unscharf endende, nicht auswertbare δ-Rockets. Bei zu hohen DOC-Konzentrationen (größer als 1,2%) werden die Thylakoidmembranen nicht quantitativ gelöst. Diese beiden Probleme treten bei Verwendung von 0,8% DOC nicht auf.

Anders als bei der CF_1-Bestimmung durch EID müssen die Thylakoidmembranen zur δ-Bestimmung einige Zeit in Triton/Na-desoxycholat inkubiert werden. Aus Tab. 15 geht hervor, welche Inkubationsbedingungen zur δ-Bestimmung vorteilhaft und notwendig sind:

	0,5h	1h	2h	3h	Bemerkung
22°C	14,5	14,0	13,5	14,5	Nach 0,5h Rocketspitze noch leicht diffus
35°C	14,5	14,5	14,5	?	Rockets undeutlicher als bei 22°C
56°C	0	0	0	0	keine Rocketbildung

Tab. 15: Behandlung von Thylakoiden zur δ-Bestimmung. Spinat-Thylakoide (0,9mg Chl/ml) in 3% Triton, 0,8% DOC werden bei verschiedenen Bedingungen inkubiert (variiert werden Inkubationsdauer und -temperatur) und anschließend eine EID mit anti-δ durchgeführt. Die Zahlen geben die δ-Rocketlängen in mm an. AS: anti-δ, 80μl 120-t/10ml Gel. Elektrophorese: 18h, 120V, 15°C.

Zur Erzielung deutlicher δ-Rockets ist eine einstündige Inkubation bei 22°C geeignet. Eine Erhöhung der Inkubationsdauer bewirkt keine Verlängerung der δ-Rockets. Die Abhängigkeit der δ-Rocketlänge von der Menge der in 3% Triton, 0,8% DOC unter den angegebenen Bedingungen gelösten Thylakoide ist linear (Abb. 31).

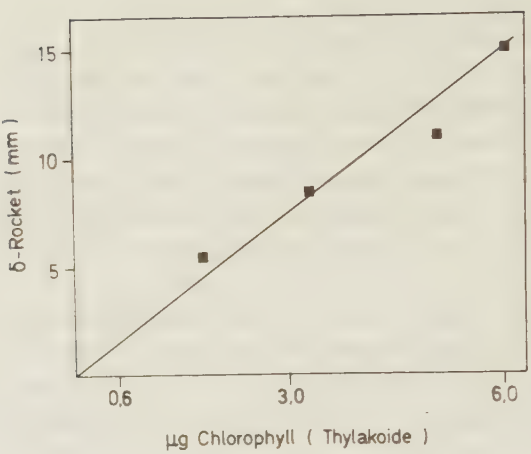


Abb. 31: EID mit detergenzgelösten Thylakoiden: Abhängigkeit der δ-Rocketlänge von der Antigenmenge.
AG: Spinatthylakoide in 3% Triton, 0,8% DOC in den angegebenen Mengen.
AS: anti-δ, 80µl 120-t/10ml Gel.
Elektrophorese: 18h, 80V, 15°C.

3.4.3. Immunologische Untersuchung δ-haltiger Fraktionen

Wichtig für die Vergleichbarkeit der mit isoliertem δ, CF_1 oder detergenzgelösten Membranen erhaltenen δ-Rockets ist die immunologische Identität der genannten Antigene gegenüber den verwendeten Antiseren. Die Abb. 32 - 34 (siehe auch Abb. 27) zeigen die Ergebnisse der für diese Arbeit wichtigen Ouchterlony-Tests. Generell kann gesagt werden, daß alle oben genannten Antigene gegenüber den AS 120-t, 167-1,2 und 3 sowie 168-1,2 und 3 immunologisch identisch sind. Bedeutend für die in Kap. 3.4.5. durchgeführte Bestimmung der δ/CF_1-Stöchiometrie ist die immunologische Identität von freiem und CF_1-gebundenem δ gegenüber dem AS 168-3 (Abb.34).

In 7 M Harnstoff gelöstes δ kann ohne Verlust seiner antigenen Eigenschaften gegen harnstoffreie Puffer wie z.B. 100 mM Tris-HCl pH 8, 10mM KCl dialysiert werden. Vor und nach Dialyse erhält man gleich lange δ-Rockets (bei unverändertem Gesamtvolumen der dialysierten Probe).

Die Aufbewahrung von δ in 7 M Harnstoff oder dem genannten Dialysepuffer bei 4°C führt innerhalb von 2 Monaten zu einem kompletten Verlust seiner antigenen Eigenschaften gegenüber den hier verwendeten Antiseren. Im Gegensatz hierzu sind

selbst nach dreimonatiger Lagerung bei -30°C keinerlei immunologische Veränderungen festzustellen (unveränderte Rocketlänge).

Abb. 32

Abb. 33

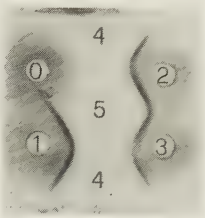


Abb. 34

Abb. 32: Reaktion des δ-Antiserums 120-t mit verschiedenen δ-haltigen Fraktionen im Ouchterlony-Test.
w: Gereinigtes δ in 7 M Harnstoff, 20mM Tricin pH 8.
x: Spinat-Thylakoide (1,4mg/ml) in 3% Triton.
y: Wie x, aber mit 0,8% Na-desoxycholat.
z: Isolierter CF_1 (Präp. 7.10.80., Spinat), in 3% Triton.
Zentrales Loch: AS 120-t (anti-δ).

Abb. 33: Reaktion der δ-Antiseren 167-1,2 und 3 mit isoliertem δ und CF_1 im Ouchterlony-Test.
0: Kontrollserum 167-0. 1: AS 167-1. 2: AS 167-2. 3: AS 167-3.
4: Isolierter CF_1 (Präp. 91, Spinat). 5: Isoliertes δ.

Abb. 34: Reaktion der δ-Antiseren 168-1,2 und 3 mit isoliertem δ und CF_1 im Ouchterlony-Test.
0: Kontrollserum 168-0. 1: AS 168-1. 2: AS 168-2. 3: AS 168-3.
4 und 5: Wie Abb. 33.

3.4.4. Bestimmung von δ/CF_1-Verhältnissen in CF_1-Präparaten und Thylakoidmembranen

Die gleichzeitige immunchemische Bestimmung von CF_1 und δ in Membranfraktionen und CF_1-Präparaten erlaubt die Berechnung von relativen δ/CF_1-Verhältnissen und gibt somit die Möglichkeit, während einer CF_1-Präparation auftretende Verluste an δ zu erkennen. Als Vergleichsbasis oder 100%-Kontrolle können in Detergentien gelöste Thylakoidmembranen dienen, da angenommen werden kann, daß thylakoidgebundener CF_1 einen maximalen δ-Gehalt aufweist.

Probe	Rocketlänge (mm)		$\frac{\delta\text{-Rocketlänge}}{CF_1\text{-Rocketlänge}}$	Bemerkung
	CF_1	δ		
1	28	13	0,46	Thylakoide
2	19	8,5	0,45	EDTA-CF_1
3	24	11	0,46	EDTA-CF_1
4	30	13	0,43	EDTA-CF_1
5	32	1,5	0,05	$CHCl_3$-CF_1
6	36	6,5	0,18	$CHCl_3$-CF_1

Tab. 16: Bestimmung von δ/CF_1-Verhältnissen in Thylakoidmembranen und verschiedenen CF_1-Präparaten.
Mit den angegebenen Proben wurde unter identischen Bedingungen eine SID mit anti-δ und anti-CF_1 durchgeführt. Der Quotient aus den beiden entsprechenden Rocketlängen (Spalte 4) stellt ein relatives Maß für den δ-Gehalt der verschiedenen Proben bezogen auf CF_1 dar.
1. Spinat-Thylakoide (1mg Chl/ml) in 3% Triton, 0,6% DOC.
2. EDTA-Extrakt von Spinat-Thylakoiden (1x konz.), in 3% Triton, 0,6% DOC.
3. Isolierter Spinat-CF_1 (Präp. 91, EDTA-extrahiert), 0,42 mg/ml in 40mM Tricin pH 7,8, 2mM EDTA.
4. Wie 3 (Präp. 94), 0,52mg/ml, gelöst wie in 3.
5. Isolierter Spinat-CF_1 (Präp. 14.1.81, Chloroform-extrahiert), 0,46mg/ml, gelöst wie in 3.
6. Wie 5 (Präp. 14.1.81), 0,5mg/ml, gelöst wie in 3.
AS: anti-CF_1, 35µl [illegible]-t/10ml Gel bzw. anti-δ, 50µl [illegible]-t/10ml Gel. Elektrophorese: 18h, 80V, 15°C.

Wie Tab. 16 zeigt, unterscheiden sich die δ/CF_1-Verhältnisse in Thylakoidmembranen, EDTA-Extrakten oder nach LIEB & RACKER (97) gereinigten CF_1-Präparaten kaum voneinander. Da sich die mit EDTA-Partikeln und ihren CF_1-haltigen Überständen erhaltenen CF_1-Rockets in den Längen quantitativ miteinander ver-

gleichen lassen (Kap. 1.4.), gilt dies somit auch für die δ-Rockets.

Durch Chloroform-Behandlung von Thylakoiden isolierter CF_1 besitzt einen gegenüber Thylakoidmembranen erniedrigten δ-Gehalt, dessen Höhe von bisher nicht bekannten Faktoren abhängt (siehe hierzu auch: BINDER et al., 29). Die in Tab. 16 aufgeführten $CHCl_3$-Präparate zeigen z.B. einen δ-Verlust von 60% bzw. 90%.

3.4.5. Bestimmung des absoluten δ-Gehalts von Spinat-CF_1

Die Stöchiometrie der kleinen Untereinheiten (δ,ε) im CF_1-Molekül ist bis heute ein Streitpunkt (12,113). Eine Lösung des Problems ist mit Hilfe der Rocketimmunelektrophorese möglich, wie hier für die Bestimmung der Anzahl der δ-Untereinheiten pro CF_1 gezeigt wird. Voraussetzung sind ein gereinigtes CF_1- und δ-Präparat (Abb. 22, 30) sowie ein Antiserum gegen δ. In der Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (103) zeigen weder CF_1 noch δ eine unterschiedliche Reaktivität im Vergleich zu BSA (29). Daher konnte diese Methode ohne Vorbehalt zur Ermittlung der CF_1- und δ-Konzentrationen verwendet werden.

Die mit dem gereinigten δ-Präparat aufgestellte Eichgerade (Rocketlänge in Abhängigkeit von der δ-Menge) ist in Abb. 28 dargestellt. Unter gleichen Bedingungen wurden mit gereinigtem CF_1 δ-Rockets erzeugt, deren Längen bestimmt und in der Eichgerade die entsprechenden δ-Mengen abgelesen (Tab. 17):

μg CF_1	mm δ-Rocket	≙ μg δ	μg CF_1/μg δ
2,0	7	0,25	8,0
2,7	10	0,35	8,8

Tab. 17: Bestimmung des absoluten δ-Gehalts von CF_1. Erläuterung im Text. AS und Elektrophorese wie in Abb. 28. Verwendetes CF_1-Präparat: 91, Spinat.

Das CF_1/δ-Gewichtsverhältnis des analysierten CF_1-Präparats beträgt nach Tab. 17 ca. 8,4. Mit Hilfe der Molekulargewichte von CF_1 und δ lassen sich unter der Annahme von 1 bzw. 2 /CF_1 die in Tab. 18 angegebenen Gewichtsverhältnisse berechnen. Das von mir experimentell gefundene Verhältnis ent-

spricht somit einer Stöchiometrie von 2 δ-Untereinheiten pro CF_1-Molekül. Da Membranfraktionen das gleiche relative δ/CF_1-Verhältnis aufweisen wie das hier verwendete CF_1-Präparat 91 (Tab. 16), gilt das gefundene Absolutverhältnis auch für thylakoidgebundenen CF_1.

Molekulargewicht		berechnetes Gewichtsverhältnis bei		Referenz
CF_1	δ	CF_1/δ	$CF_1/2\delta$	
310500	17500	17,7	8,9	125,130
325000	21000	15,5	7,8	56,114

Tab. 18: Berechnung theoretischer Gewichtsverhältnisse von CF_1 zu δ aus den Molekulargewichten für die angenommenen Untereinheiten-Stöchiometrien 1δ bzw. $2\delta/CF_1$.

4. Funktion der δ- und ε-Untereinheit bei der Interaktion von CF_1 mit der Thylakoidmembran

Im Einklang mit Befunden bei Mikroorganismen (61,171,175) wird auch für die δ-Untereinheit der photosynthetischen ATP-Synthase angenommen, daß sie für die Bindung des F_1-Teils an die Membran essentiell ist, wie NELSON & KARNY (129) und YOUNIS et al. gezeigt haben sollen (12,62,113,130,132,166). Während NELSON & KARNY (129) nur die Rekonstitution der Photophosphorylierung von EDTA-Partikeln mit δ-freiem CF_1 und δ gezeigt und allenthalben die Beteiligung von δ an der Bindung diskutiert haben, existiert bei YOUNIS et al. (204) ein entsprechender Versuch, der aber in mehrerer Hinsicht Anlaß zur Kritik gibt, wie schon in der Einleitung erwähnt und noch ausführlich diskutiert wird. Die Nichtexistenz eines wirklichen Beweises für δ als essentielles Bindungsprotein des CF_1 und das dogmatische Festhalten an dieser "Tatsache" veranlaßten mich zur näheren Untersuchung dieses Problems, das mit den hergestellten Werkstoffen (δ-freier CF_1, δ und EDTA-Partikel), Werkzeugen (Antikörper gegen δ und CF_1) sowie dem

neuen Verfahren (immunchemische Bestimmung von CF_1 und δ) gelöst werden soll.

4.1. Bindung von chloroformextrahiertem CF_1 an EDTA-behandelte Thylakoide

Mit den beiden neuen Bestimmungsmethoden für CF_1 und δ in Membranfraktionen wurde die Möglichkeit einer Bindung von "δ-freiem" CF_1 nach Younis et al. (204) an CF_1-verarmte Thylakoide untersucht. Hierzu wurden EDTA-Partikel mit steigenden Mengen eines chloroformextrahierten CF_1-Präparats in Gegenwart von $MgCl_2$ inkubiert und anschließend der CF_1- und δ-Gehalt der Thylakoide bestimmt (Abb. 35). Die erhaltenen Ergebnisse entsprechen nicht den Erwartungen und stehen im Gegensatz zu den bisher vertretenen Ansichten.

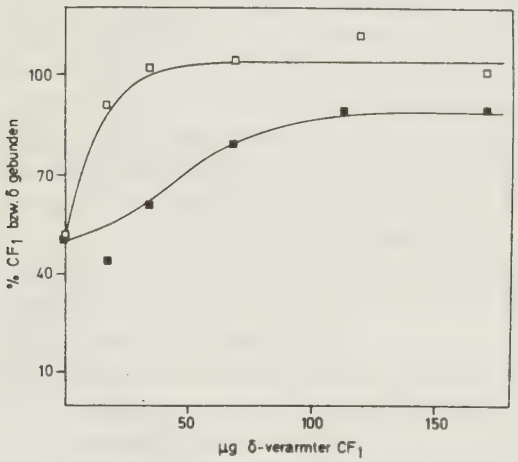


Abb. 35: Bindung eines nach YOUNIS et al. isolierten CF_1-Präparats an EDTA-behandelte Thylakoide.
0,5ml Ansatz enthalten: EDTA-Partikel (50µg Chl, CF_1-Restgehalt: 50%), δ-verarmter CF_1 in den angegebenen Mengen sowie die in Kap. VI.14. genannten Substanzen. Nach 15min Inkubation bei RT werden die Ansätze zentrifugiert, die Membranen wie in Kap. VI.13 angegeben gewaschen und schließlich in 3% Triton, 0,8 % DOC gelöst.
CF_1- und δ-Bestimmung in den Membranfraktionen durch EID; AS: anti-CF_1, 25µl 152-t/10ml Gel; anti-δ, 80µl 120-t/10ml Gel. Elektrophorese: 18h, 80V, 15°C. Die Rocketlängen (mm/10µg Chl) der einzelnen Proben werden auf die der unbehandelten Thylakoide (100%) bezogen. Kontrollwert der unbehandelten Thylakoide: 43mm/10µg Chl (CF_1-Rocket), 38mm/10µg Chl (δ-Rocket).
□ CF_1-Bestimmung; ■ δ-Bestimmung.

Nach Abb. 37 lassen sich folgende Aussagen machen:

a. Die CF_1 Bindungsstellen auf den EDTA-Partikeln lassen sich mit dem chloroformextrahierten CF_1 wieder zu maximal 100% bezogen auf unbehandelte Thylakoide besetzen.
b. Der δ-Gehalt der Membran erhöht sich mit steigenden zugesetzten CF_1-Mengen.
c. Die Zunahme des δ- bzw. CF_1-Gehalts auf der Membran verläuft nicht proportional: Mit steigenden zugesetzten CF_1-Mengen erhöht sich das δ/CF_1-Verhältnis.
d. Im Bereich nicht-sättigender δ-Konzentrationen kann CF_1 die Bindungsstellen schon zu maximal 100% besetzen.

Aus diesen Beobachtungen ergeben sich mehrere wichtige Schlußfolgerungen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von YOUNIS et al. (204) bindet auch chlorformextrahierter CF_1 an EDTA-Partikel. Die dabei gleichzeitig auftretende Zunahme des membrangebundenen δ zeigt zwar die Anwesenheit von δ im " YOUNIS-Präparat " an, kann aber für die CF_1-Bindung nicht verantwortlich sein, da schon bei geringer δ-Zunahme eine komplette Besetzung der CF_1-Bindungsstellen auf der Membran erfolgt. Mit anderen Worten: δ-freier CF_1 kann an CF_1-verarmte Thylakoide binden. Im Gegensatz zur herkömmlichen Auffassung ist δ für die CF_0-CF_1-Bindung nicht essentiell.

Setzt man den chloroformextrahierten CF_1 im Überschuß zu, so kann hierdurch der δ-Gehalt auf der Membran erhöht werden (Änderung des δ/CF_1-Verhältnisses). Hält man sich vor Augen, daß sich hierbei das Verhältnis von δ-haltigem zu δ-freiem CF_1 im Inkubationsansatz nicht ändert, so deutet dieser Befund auf eine bevorzugte Bindung des δ-haltigen Enzyms gegenüber δ-freiem an EDTA-Partikel hin. Bei gleicher Affinität dürfte sich das δ/CF_1-Verhältnis auf der Membran nicht ändern.

Als Nebenergebnis hat dieser Versuch die Anwesenheit von δ im chloroformextrahierten CF_1 gezeigt. Der durch SDS-Gelanalyse zunächst nicht festgestellte δ-Gehalt konnte dann durch Rocketimmunelektrophorese zu 10% im Vergleich zu membrangebundenem CF_1 bestimmt werden (Tab. 16, Probe 5). Eine mit Hilfe der hier gewonnenen Erkenntnisse entwickelte Methode

zur Herstellung eines δ-freien CF_1-Präparats habe ich schon in Kap. 3.1. besprochen.

4.2. Rekonstitution der Photophosphorylierung von EDTA-behandelten Thylakoiden durch δ-verarmten bzw. δ-freien CF_1 und isolierte δ-Untereinheit

An die Ergebnisse des vorigen Abschnitts schließen sich 2 wichtige Fragen an:

a. Läßt sich durch Bindung von δ-freiem CF_1 die Photophosphorylierung von EDTA-Partikeln rekonstituieren?
b. Welche Auswirkungen hat eine Änderung des δ/CF_1-Verhältnisses der Thylakoidmembran auf die Photophosphorylierungs-Kapazität?

Die folgenden Versuche sollen diese Fragen beantworten.

4.2.1. Rekonstitution der Photophosphorylierung bei kompletter Besetzung der freien Bindungsstellen durch δ-verarmten CF_1

EDTA-Partikel werden mit einer konstanten Menge an δ-verarmtem CF_1 (10% Rest-δ) und steigenden δ-Mengen inkubiert. Die zugesetzte CF_1-Menge wird so ausgewählt, daß alle Bindungsstellen auf den Thylakoiden besetzt werden, der δ-Gehalt der Membran sich aber nur geringfügig ändert (siehe auch Abb. 35). Dieser Versuch (Abb. 36) liefert die folgenden Ergebnisse:

a. Trotz kompletter Besetzung der CF_1-Bindungsstellen der Thylakoidmembran durch CF_1 wird die Photophosphorylierungs-Kapazität bei geringer Zunahme an membrangebundenem δ nur wenig stimuliert.
b. Durch Inkubation mit zusätzlicher, isolierter δ-Untereinheit steigt der δ-Gehalt der Membran an. Das isolierte δ ist also noch bindungsaktiv.
c. Zusätzliches δ wird maximal bis zu einem prozentualen δ/CF_1-Verhältnis von 1:1 bezogen auf unbehandelte Thylakoide gebunden. Sowohl CF_1 als auch δ besetzen die freien Bindungsstellen der Membran maximal zu ca. 100%.
d. Die Fähigkeit von CF_1 zur Rekonstitution der Photophosphorylierung von EDTA-Partikeln ist von gebundener δ-Untereinheit abhängig.

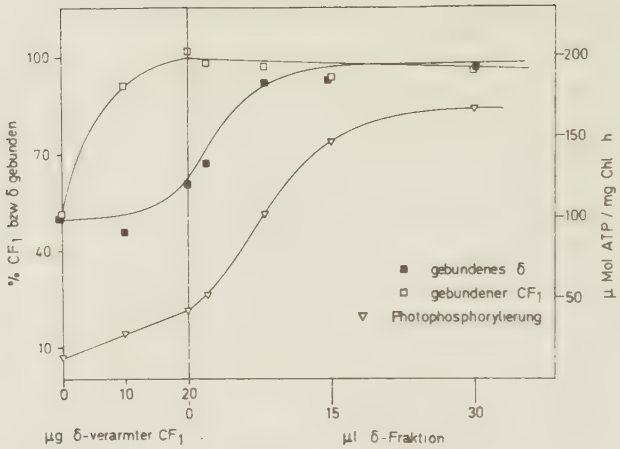


Abb. 36: Rekonstitution der Photophosphorylierung von EDTA-Partikeln durch δ-verarmten CF_1 und isolierte δ-Untereinheit. EDTA-behandelte Thylakoide (50µg Chl) werden mit δ-verarmtem CF_1 (20µg) an CF_1 gesättigt (siehe hierzu Abb. 35) und zusätzlich mit steigenden δ-Mengen inkubiert. Durchführung des Versuchs, CF_1- und δ-Bestimmung wie in Abb. 35. Messung der Photophosphorylierung mit PMS wie in Kap. VI.14 - 16 beschrieben. Kontrollwerte der unbehandelten Thylakoide: 480µMol ATP/mg Chl·h (Photophosph.); 43 mm CF_1-Rocket/10µg Chl; 18 mm δ-Rocket/10µg Chl.

Wie schon aus Abb. 35 hervorging lassen sich auch durch Inkubation von EDTA-Partikeln mit steigenden Mengen an δ-verarmtem CF_1 Thylakoide mit maximalem CF_1 und variierendem δ-Gehalt herstellen. Solche Membranen zeigen eine ähnliche Abhängigkeit der Photophosphorylierung vom δ-Gehalt (wie in Abb. 36).

Da durch Bindung von δ-freiem CF_1 an EDTA-Partikel mit 50% CF_1-Restgehalt die Photophosphorylierungs-Kapazität nicht bedeutend erhöht wird, kann geschlossen werden, daß δ-freier CF_1 nicht einmal strukturell aktiv wird, die Protonen-Permeabilität der Membranen also nicht drastisch herabsetzt. Erst die zusätzliche Bindung von δ bewirkt eine Erhöhung der Photophosphorylierungs-Kapazität. Die Aufgabe von δ ist also in der Kopplung des H^+-Stroms an die ATP-Synthase-Aktivität zu sehen und nicht in der Bindung von CF_1 an CF_0.

4.2.2. Rekonstitution der Photophosphorylierung von EDTA-Partikeln bei Limitierung der Rückbindung durch δ-freien CF_1 und steigenden δ-Mengen

Wie schon durch Ergebnisse aus vorhergehenden Kapiteln belegt, ist zur kompletten Besetzung der CF_1-Bindungsstellen in EDTA-Partikeln ein CF_1-Überschuß notwendig. Limitiert man die Rückbindungsreaktion durch die CF_1-Menge, so erhält man nur teilweise restaurierte Thylakoidmembranen mit freien Bindungsstellen bei noch gleichzeitig vorhandenen ungebundenen CF_1-Molekülen. Die Frage ist, ob unter diesen Bedingungen eine Stimulierung der Rückbindung durch δ beobachtet werden kann. Die Verwendung von δ-freiem CF_1 soll auch noch einmal eindeutig die Frage nach der Rekonstitutions(un)fähigkeit des δ-freien Enzyms klären.

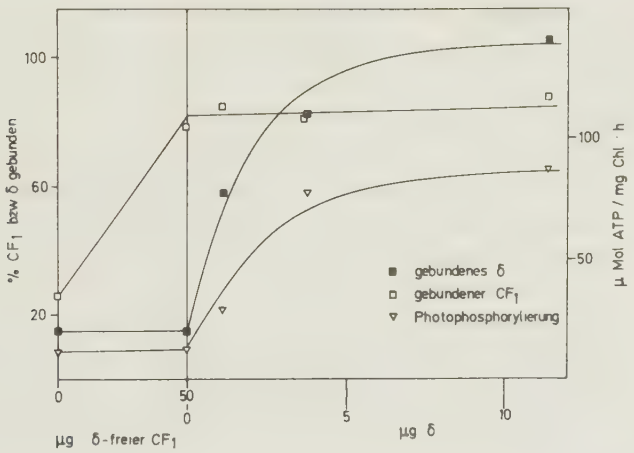


Abb. 37: Rekonstitution der Photophosphorylierung von EDTA-Partikeln mit δ-freiem CF_1 und gereinigter δ-Untereinheit bei CF_1-limitierter Rückbindung.
0,5ml Rekonstitutionsansatz enthalten: EDTA-Partikel (50µg Chl), 0 bzw. 50µg δ-freien CF_1, isoliertes δ (in 100mM Tris-HCl pH 8, 10mM KCl) in den angegebenen Mengen und die in Kap. VI.14. angegebenen Substanzen. Durchführung des Versuchs wie in Abb. 35. CF_1- und δ-Bestimmung durch EID; AS: anti-CF_1, 25µl 152-t/10ml Gel bzw. anti-δ, 80µl 120-t/10ml Gel. Elektrophorese: 18h, 120V, 15°C. Kontrollwerte der unbehandelten Thylakoide: 550µMol ATP/mg Chl·h (Photophosph.); 62mm CF_1-Rocket/10µg Chl (100%); 30mm δ-Rocket/10µg Chl (100%).

Der in Abb. 37 dargestellte Versuch liefert folgende Ergebnisse:

a. Durch die Bindung des verwendeten CF_1-Präparats wird der δ-Gehalt der Thylakoide nicht erhöht. Es ist somit für diesen Versuch als δ-frei zu bezeichnen (im Gegensatz zu einem nach YOUNIS et al. präparierten CF_1).
b. Trotz Rückbindung von CF_1 wird die Photophosphorylierungs-Kapazität der Membranen nicht erhöht.
c. Erst die zusätzliche Bindung von δ bewirkt eine Steigerung der Photophosphorylierungs-Kapazität.
d. Durch zusätzlich gebundenes δ wird der rückgebundene CF_1-Anteil nicht erhöht.
e. Die Rückbindung von δ geht über den prozentualen Anteil von CF_1 hinaus und erreicht ca. 100% bezogen auf unbehandelte Thykakoide.

Die Ergebnisse (b - c) dieses Versuchs bekräftigen noch einmal die Schlußfolgerungen des Abschnitts 4.2.1. Die zusätzlichen unter d und e formulierten Ergebnisse liefern 2 interessante Aspekte zur CF_1-Bindung:

zu d: Wie in Kap. 3.1. und 4.1. gezeigt wird δ-haltiger CF_1 gegenüber δ-freiem bevorzugt an EDTA-Partikel gebunden. Trotzdem stimuliert zusätzliches δ die Rückbindung des δ-freien Enzyms nicht. Dieses Phänomen wird in Kap. 4.4. weiterverfolgt.

zu e: Die Beobachtung, daß δ prozentual (bezogen auf unbehandelte Thylakoide) die CF_1-Menge auf der Thylakoid-Membran übersteigen kann, deutet auf die Fähigkeit von δ hin, auch alleine an die Membran binden zu können. Diese Frage wird im folgenden Abschnitt behandelt.

4.3. Bindung von δ an EDTA-behandelte Thylakoide

Zur Beurteilung der Funktion von δ ist die Bestimmung seines Wirkortes im ATP-Synthase-Komplex von Bedeutung. Hier soll untersucht werden, ob die δ-Untereinheit nur mit dem CF_1- oder auch mit dem CF_0-Teil des Komplexes interagiert, es also eine Bindungsstelle für δ auf der Thylakoidmembran (CF_0) gibt.

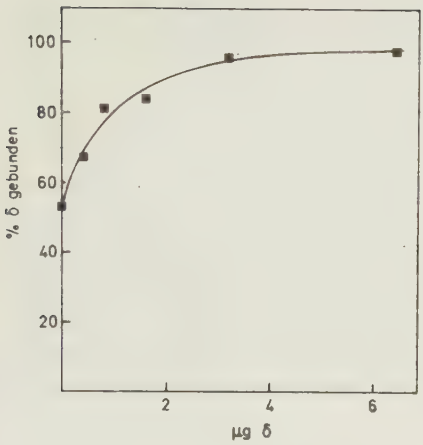


Abb. 38: Bindung von isoliertem δ an EDTA-behandelte Thylakoide.
0,5ml Ansatz enthalten: EDTA-Partikel (50µg Chl, δ-Restgehalt: 50%), isoliertes δ (in 50mM Tricin pH 8, 10mM NaCl) in den angegebenen Mengen und 10mM $MgCl_2$. Nach 15 min Inkubation werden die Membranen zweimal gewaschen (Kap. VI.13.) und in 40µl 4,5% Triton, 0,6% DOC gelöst. Bestimmung der membrangebundenen δ-Untereinheit durch EID; AS: anti-δ, 80µl 120-t/10ml Gel. Kontrollwert der unbehandelten Thylakoide (100%): 37,5 mm δ-Rocket/10µg Chl.

Nach Inkubation von EDTA-Partikeln mit steigenden δ-Mengen wird anschließend die membrangebundene δ-Untereinheit bestimmt. Der Versuch ergibt, daß δ auch alleine an CF_1-verarmte Thylakoide binden kann. Eine Rückbindung von maximal 100% bezogen auf unbehandelte Thylakoide (siehe auch Abb. 37) spricht für eine spezifische (CF_0-limitierte) Bindung auf der Thylakoidmembran. Somit ist δ sowohl mit dem CF_1- als auch dem CF_0-Teil des Komplexes verbunden.

Das Ergebnis wirft die Frage auf, ob die Rückbindung von δ an CF_0 eine Erniedrigung der Protonen-Permeabilität der EDTA-behandelten Membranen im Sinne eines DCCD-Effekts bewirken kann. DCCD (Dicyclohexylcarbodiimid) kann die strukturelle Rolle des CF_1 übernehmen und in EDTA-Partikeln, die noch CF_1 enthalten, die Photophosphorylierung durch Abdichtung der Membran für Protonen teilweise rekonstituieren (111, 188). Wie aus Tab. 19 hervorgeht ist auch bei nahezu 100%iger Besetzung der δ-Bindungsstellen in EDTA-Partikeln mit 43% Rest-CF_1 keine Erhöhung der Photophosphorylierung gegenüber EDTA-Partikeln festzustellen. δ ist also wohl nicht in der Lage, den CF_0-Protonenkanal abzudichten.

Probe	µMol ATP/mg Chl·h	mm Rocket/10µg Chl CF_1	mm Rocket/10µg Chl δ
Unbehandelte Thylakoide	656	42,2	25,3
EDTA-Partikel	10	18,2	13,6
EDTA-Partikel + 100µl δ-Fr.	10	17,9	24,3

Tab. 19: Bestimmung der Photophosphorylierungs-Kapazität von Thylakoiden, EDTA-Partikeln und δ-gesättigten EDTA-Partikeln. 0,5ml Rekonstitutionsansatz enthalten: Unbehandelte Thylakoide bzw. EDTA-Partikel (je 50µg Chl), 100µl einer δ-Fraktion (in 50mM Tricin pH 8, 50mM NaCl) wie angegeben und die in Kap. VI.14. angegebenen Substanzen. Durchführung des Versuchs wie in Abb. 35. CF_1- und δ-Bestimmung durch EID wie in Abb. 35.

4.4. Vergleich der Bindung von δ-haltigem und δ-freiem CF_1 an EDTA-behandelte Thylakoide

Die δ-Untereinheit besitzt sowohl am CF_1- als auch am CF_0-Teil des ATP-Synthase-Komplexes einen Bindungsort und stellt somit eine Verbindung zwischen CF_0 und CF_1 her. Andererseits kann aber CF_1 ohne δ an die Membran binden. Hieraus ergeben sich 2 Probleme:

a. Läßt sich die Bindung von δ-freiem bzw. δ-haltigem CF_1 an CF_0 unterscheiden?
b. Welche weitere(n) Untereinheit(en) ist (sind) an der Bindung von CF_1 an CF_0 beteiligt?

In diesem Abschnitt soll zunächst die erste Frage behandelt werden. Die Bindung von δ-freiem bzw. δ-haltigem CF_1 an EDTA-Partikel läßt in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration keinen Unterschied erkennen: Die erhaltenen Bindungskurven weisen die gleiche Steilheit in der Anstiegsphase auf (Abb. 39). Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit der Tatsache, daß isolierte δ-Untereinheit die Bindung von δ-freiem CF_1 an EDTA-Partikel nicht stimuliert (Abb. 37). (Anmerkung: Die nicht erreichte Sättigung der EDTA-Partikel durch CF_1 mag auf eine Fehlbestimmung des 100%-Wertes zurückzuführen sein. Er liegt mit 59,5 mm CF_1-Rocket/10µg Chl unter den angegebenen Bedingungen vergleichsweise hoch. Diese Tat-

sache hat aber keine Bedeutung für die gezogenen Schlußfolgerungen.)

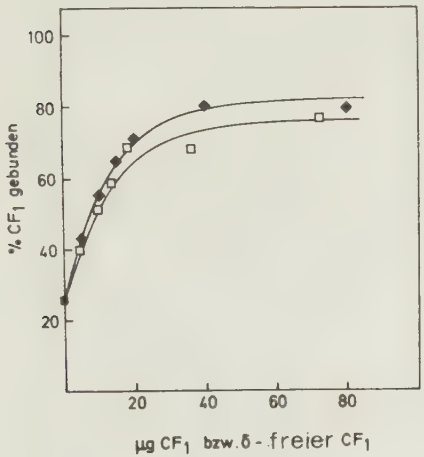


Abb. 39: Bindung von δ-freiem und δ-haltigem CF_1 an EDTA-behandelte Thylakoide in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. 0,5ml Ansatz enthalten: EDTA-Partikel (50μg Chl, CF_1-Restgehalt: 26%), δ-haltigen (◆) und δ-freien CF_1 (□) in den angegebenen Mengen sowie die in Kap. VI.14. genannten Substanzen. Durchführung des Versuchs und CF_1-Bestimmung wie in Abb. 35. Kontrollwert der unbehandelten Thylakoide: 59,5 mm CF_1-Rocket/10μg Chl.

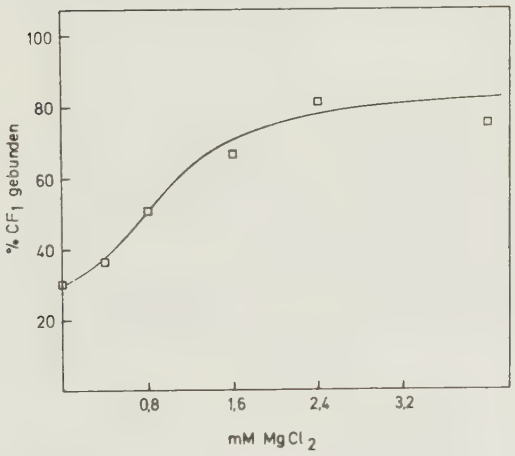


Abb. 40: Bindung von δ-verarmtem CF_1 an EDTA-behandelte Thylakoide in Abhägigkeit von der $MgCl_2$-Konzentration. 0,5ml Ansatz enthalten: EDTA-Partikel (50μg Chl, CF_1-Restgehalt: 28%), 50μg δ-verarmten CF_1 (δ-Restgehalt: 10%) und $MgCl_2$ in den angegeben Konzentrationen. Nach 10 min Inkubation bei RT werden die Ansätze zentrifugiert, die Membranen zweimal gewaschen (Kap. VI.13.) und in 35μl 4,5% Triton, 1,6% DOC gelöst. Die Detergenzkonzentrationen wurden höher gewählt als üblich, da sich die Membranen wegen der niedrigen Ionenstärke (Schwellungszustand) nur schlecht sedimentieren ließen und somit ein Teil des Überstandes nicht abpipettiert werden konnte. Bestimmung des membrangebundenen CF_1 durch EID; AS: anti-CF_1, 25μl 152-t/10ml Gel. Elektrophorese: 18h, 80V, 15°C. Kontrollwert der unbehandelten Thylakoide: 47,3mm CF_1-Rocket/10μg Chl.

Auch im Kationenbedarf einer CF_0-CF_1-Bindung (Kap. 2.4.) ließen δ-haltiges und δ-freies Enzym keine Unterschiede erkennen. Die zur halbmaximalen Bindung notwendige Mg^{2+}-Konzentration beträgt sowohl für δ-freien als auch für δ-haltigen CF_1 0,9mM (Abb. 13 und 40).

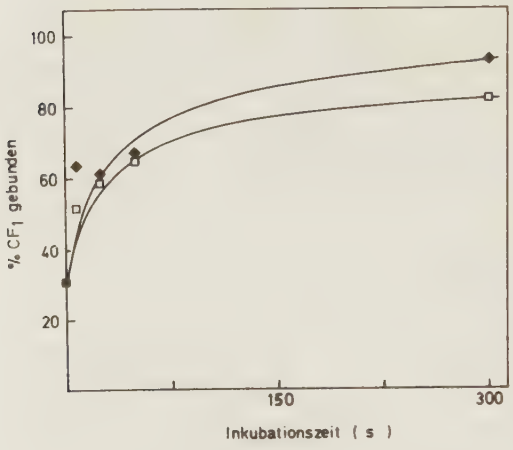


Abb. 41: Kinetik der Bindung von δ-freiem und δ-haltigem CF_1 an EDTA-behandelte Thylakoide.
1ml Ansatz enthält: EDTA-Partikel (20µg Chl, CF_1-Restgehalt: 31%), je 20µg δ-freien (□) bzw. δ-haltigen CF_1 (◆) und die in Kap. VI.14. angegebenen Substanzen. Gestartet wird die Bindungsreaktion durch Einpipettieren der EDTA-Partikel, gestoppt wird sie durch Sedimentation der Membranen in einer EPPENDORF-Mikrozentrifuge, die innerhalb weniger Sekunden ihre maximale Umdrehungsgeschwindigkeit erreicht. Danach werden die Überstände entfernt, die Membranen zweimal gewaschen (Kap. VI.13.) und in 20µl 3% Triton, 0,8% DOC gelöst. Bestimmung des membrangebundenen CF_1 durch EID; AS: anti-CF_1, 25µl 152-t/10ml Gel. Elektrophorese: 18h, 80V, 15°C. Kontrollwert der unbehandelten Thylakoide: 51mm CF_1-Rocket/10µg Chl.
Anmerkung: Um die Bindungskinetik in ihrer Anfangsphase zeitlich auflösen zu können wurden im vorliegenden Versuch EDTA-Partikel und CF_1 in größerer Verdünnung eingesetzt als üblich (1:5).

Die Ergebnisse (Abb. 37,39,40,13) deuten darauf hin, daß die δ-Untereinheit keinen maßgeblichen Beitrag zur Bindungsstärke der CF_0-CF_1-Bindung leistet. Wie ist dann aber die anscheinend bevorzugte Bindung des δ-haltigen CF_1 gegenüber δ-freiem an EDTA-Partikel zu erklären?

Eine denkbare Möglichkeit wäre, daß besondere sterische Verhältnisse die Bindung des δ-haltigen CF_1 an CF_0 begünstigen, indem die Wahrscheinlichkeit der für die Bindungsreaktion richtigen Orientierung der Moleküle erhöht wird. Wür-

den in diesem Falle δ-freier und δ-haltiger CF_1 um Bindungsstellen konkurrieren, so würde der δ-haltige CF_1 in einem bestimmten Zeitintervall häufiger reagieren können als δ-freier. Trotz gleicher Bindungsstärke käme es so zu einer bevorzugten Bindung des δ-haltigen Enzyms. Ein Hinweis für die Richtigkeit einer solchen Hypothese wäre eine unterschiedliche Bindungskinetik. Wie Abb. 41 aber zeigt, ist der zeitliche Verlauf der Rückbindung von δ-freiem und δ-haltigem CF_1 an EDTA-Partikel identisch. Experimentell wurde dieses Problem nicht weiter verfolgt, in der Diskussion wird aber eine Interpretationsmöglichkeit gegeben.

4.5. Isolierung und Charakterisierung von ε und δ,ε -freiem CF_1 ($\alpha\beta\gamma$)

Zur Beantwortung der im vorigen Abschnitt gestellten Frage, welche Untereinheiten an der CF_0-CF_1-Bindung beteiligt sind, müssen zunächst einige Voraussetzungen erfüllt werden. In Anlehnung an die Ergebnisse mit F_1 aus Escherichia coli (175) bot sich zunächst folgende Arbeitshypothese an: Da bei E. coli δ und ε an der F_0-F_1-Bindung beteiligt sind, mag für ε aus CF_1 eine funktionale Analogie bestehen. Zur Klärung dieser Frage ist die Isolierung von ε und eines $\alpha\beta\gamma$-Fragments notwendig, das durch Antikörper zwecks quantitativer Bestimmung angezeigt werden muß und möglichst noch als ATPase aktiv sein sollte. In Kombination mit isoliertem δ und ε kann dann die Bindung des $\alpha\beta\gamma$-Fragments an die Membran studiert werden. Hilfreich für die Untersuchungen wäre noch ein Antiserum gegen ε.

4.5.1. Isolierung der ε-Untereinheit aus CF_1

Bei der zur Isolierung von δ beschriebenen Methode (Kap. 3.2.2.) fallen bei der Gelfiltration über Sephacryl S 200 auch ε-haltige Fraktionen an (Abb. 23). Diese werden vereinigt (evtl. von mehreren Säulentrennungen) und durch Druckfiltration über Amicon YM 5-Filter (Abscheidegrad: 5000d) konzentriert. Noch vorhandene Spuren von α, β und δ können durch Ionenaustauschchromatographie mit DEAE-Cellulose (DE 52, WHATMAN) leicht abgetrennt werden. Hierzu äquilibriert

man die Säule mit 7 M Harnstoff, 20mM Tricin pH 8. Die Salzkonzentration im zu trennenden Proteingemisch sollte bei oder unter 20mM (neben 20mM Tricin) liegen. Unter diesen Bedingungen wird ε nicht an das Gelmaterial gebunden und kann so im Durchlauf in fast reiner Form aufgefangen werden (Abb. 42). Die Druckfiltration und die Ionenaustauschchromatographie können auch in der Reihenfolge vertauscht werden.

Mit einer auf diese Weise isolierten ε-Untereinheit sollten Kaninchen zur Produktion von Antikörpern angeregt werden. In zwei unternommenen Versuchen konnten in den Kaninchenseren jedoch keine Antikörper gegen ε festgestellt werden.

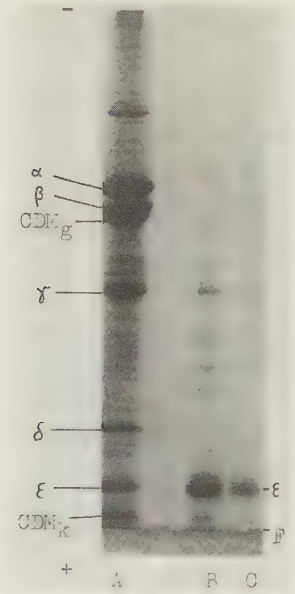


Abb. 42: SDS-Gelelektrophorese: Isolierte ε-Untereinheit aus Spinat-CF_1.
A: CF_1-Rohpräparat (141, Spinat, ca. 15µg), zum Vergleich.
B und C: Isolierte ε-Untereinheit.
CDM_g und CDM_k: Große bzw. kleine Untereinheit der Carboxydismutase.
F: Front.

4.5.2. Eigenschaften der isolierten ε-Untereinheit

Das Fluoreszenz-Emissionsspektrum der isolierten ε-Untereinheit (Abb. 43) zeigt eine typische Tryptophanemission. Im Gegensatz zur bisherigen Auffassung (56,70,124,206) ist diese Aminosäure also wohl doch im CF_1-Molekül enthalten. Interessanterweise kann eine solche Emission im intakten CF_1 nicht beobachtet werden. Dieser Befund steht im Einklang mit

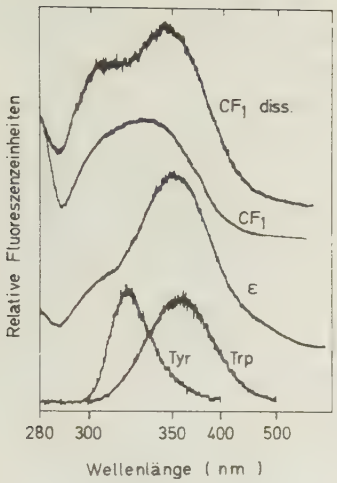


Abb. 43: Fluoreszenz-Emissions-Spektrum von nativem und harnstoffdissoziertem CF_1 sowie der ε-Untereinheit.
(siehe hierzu auch Kap. VI.21.)
Anregungswellenlänge: 280nm.
Proben: CF_1 (Präp. 91) ca. 0,1 mg/ml in 40mM Tricin pH 7,8, 2mM EDTA. CF_1 diss.: CF_1 wie oben, gelöst und dissoziert in 7 M Harnstoff, 20mM Tricin pH 8,0.
ε: Isolierte ε-Untereinheit (homogen nach SDS-Gelanalyse) in 7 M Harnstoff, 20mM Tricin pH 8,0.
Tyr: Tyrosin. Trp: Tryptophan.

bisher veröffentlichten Ergebnissen (23,206). Erklärungsmöglichkeiten für die beobachteten Phänomene sind, daß im intakten CF_1-Molekül entweder das Tryptophan gar nicht angeregt wird oder daß seine Fluoreszenz gequencht wird. Nach Dissoziation von CF_1 in 7 M Harnstoff kann tatsächlich eine Tryptophanfluoreszenz beobachtet werden (Abb. 43). Ihr Ausbleiben im nativen CF_1 ist somit wohl auf eine spezielle Umgebung des Tryptophan-Restes zurückzuführen. Soeben erschien eine Veröffentlichung, die den Tryptophangehalt der ε-Untereinheit bestätigt (15).

Das Verhalten von ε auf Ionenaustauscher-Säulen (Abschnitt 4.5.1.) spricht für einen isoelektrischen Punkt, der weit im Alkalischen liegt. STERNWEIS (175,176) fand für ε aus Escherichia coli einen IEP von 10,5.

4.5.3. Isolierung und Charakterisierung eines δ, ε-freien CF_1-Moleküls

Nach YOUNIS et al. (204) läßt sich durch Chloroformbehandlung von Spinat-Thylakoiden ein nahezu δ-freier CF_1 erhalten. Überträgt man diese Methode auf Salat, so zeigt sich, daß im wäßrigen Überstand nach Chloroform-Extraktion ebenfalls die δ-Untereinheit fehlt. Eine Analyse des aus diesem Überstand

mit 50% Ammoniumsulfat gefällten Proteins durch SDS-PAGE führte zu dem überraschenden Ergebnis, daß jetzt auch die ε-Untereinheit abwesend war. Sie konnte im entsprechenden Überstand nachgewiesen werden. Hiermit war also ein Ansatzpunkt zur Isolierung eines δ,ε -freien CF_1 gegeben.

Ammoniumsulfat-Fällung des αβγ-Fragments aus dem Chloroform-Überstand hat einen großen Verlust an ATPase-Aktivität zur Folge (siehe unten). Gleichzeitig können im Ouchterlony-Test einige Tage nach Fällung wie beim chloroformextrahierten CF_1 aus Spinat immunologische Veränderungen des αβγ-Fragments beobachtet werden (Abb. 44, 45), die sich in Abschwächung, Verschwinden oder zusätzlichem Auftreten von Präzipitationslinien äußern. Typisch ist, daß das gefällte Protein nach einigen Tagen Aufbewahrung als Ammoniumsulfat-Fällung kaum noch in den üblichen Puffern löslich ist. Eine durchgeführte Säurefällung (115) der Proteine führt zu den gleichen Problemen. Somit scheiden Ammoniumsulfat- und Säurefällung zur Abtrennung der ε-Untereinheit vom αβγ-Fragment aus.

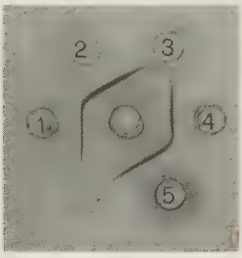


Abb. 44: Ouchterlony-Test: Unter verschiedenen Bedingungen gelagerter, chloroform-extrahierter CF_1 aus Salat.
1: Salat-Thylakoide (0,66mg Chl/ml) in Triton, 0,8% DOC.
2: 1 Tag bei +4°C aufbewahrter Chloroform-Überstand.
3: Wie 2, bei -20°C aufbewahrt.
4: $(NH_4)_2SO_4$-Fällung des $CHCl_3$-Überstands, zentrifugiert und im gleichen Volumen 40mM Tricin pH 7,8, 2mM EDTA aufgenommen (1 Tag alt).
5: Säurefällung wie 4.
Zentrales Loch: AS 142-t (anti-CF_1, Salat).

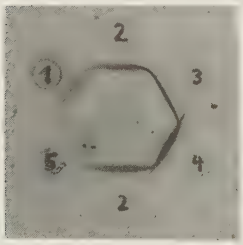


Abb. 45: Ouchterlony-Test: Vergleich von EDTA- und $CHCl_3$-extrahiertem CF_1 aus Spinat bzw. Salat nach Ammoniumsulfat-Fällung (In Klammern: Lagerungszeit im gefällten Zustand).
1: Salat-CF_1, $CHCl_3$-extr., 8,4µg Protein (6 Tage). 2: Frisch hergestellter $CHCl_3$-Überstand, 8,4µg Protein. 3: Salat-CF_1, EDTA-extr., 20µg Protein (ca. 2 Jahre). 4: Spinat-CF_1, EDTA-extr., 12µg P., (7 Tage). 5: Spinat-CF_1, $CHCl_3$-extr., 10µg P. (13 Tage). Zentrales Loch: AS 152-t (anti-CF_1, Spinat).

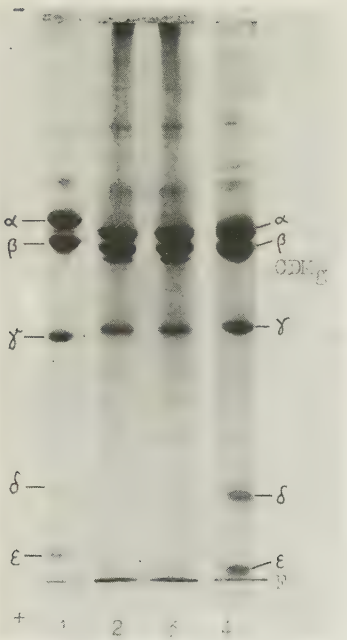


Abb. 46: SDS-Gelelektrophorese: Durch Gelfiltration über Sephacryl S 300 gewonnener δ, ε -freier Salat-CF_1.
1: Spinat-CF_1 (zum Vergleich, siehe Diskussion)
2 und 3: δ, ε -freier Salat-CF_1. Es ist nicht klar, ob es sich bei der im ε-Bereich angezeigten schwachen Bande um Reste von ε oder die kleine Untereinheit der Carboxydismutase handelt.
4: Salat-CF_1 (EDTA-extrahiert).
CDM_g: Große Untereinheit der Carboxydismutase. F: Front.

Nimmt man an, daß in dem durch Chloroform-Behandlung von Salat-Thylakoiden erhaltenen wässrigen Überstand ε schon in dissozierter Form vorliegt, sollte eine leichte Abtrennung vom αβγ-Fragment durch Gelfiltration möglich sein. Hierzu wird der Überstand durch Druckfiltration über Amicon XM 100-Filter (Abscheidegrad: 100kd) auf ein kleines Volumen (2 bis 2,5ml) konzentriert und anschließend einer Gelfiltration über Sephacryl S 300 (Kap. VI.7.) unterworfen. Wegen der Kältelabilität des Enzyms werden alle Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt. Auf diese Weise kann ein sehr sauberes αβγ-Fragment abgetrennt werden (Abb. 46), das ohne Verlust seiner antigenen Eigenschaften durch Ammoniumsulfat gefällt werden kann.

Nach Hitze-Aktivierung (Kap. VI.17.) weist ein solches Präparat je nach Fraktion eine ATPase-Aktivität von 6,5 bis 8,9 μMol P_i/mg Protein·min auf (aus dem Chloroform-Überstand durch Ammoniumsulfat bzw. Säure gefälltes Protein besitzt eine Aktivität von 0,9 bzw. 2,0 ATPase-Einheiten).

Für quantitative Bestimmungen durch RID ist von Bedeutung, daß bei Verwendung des AS '50-t (anti-Spinat-CF_1) sowohl EDTA- als auch Chloroform-extrahierter Salat-CF_1 nur partiell identisch mit Spinat-CF_1 sind (Abb. 45). Vergleichende Bestimmungen sind mit diesem Antiserum also nicht direkt möglich. Gegenüber dem AS '42-t (anti-Salat-CF_1) weisen jedoch alle 3 genannten Antigene sowie auch detergensgelöste Salat-Thylakoide immunologische Identität auf (Daten nur teilweise gezeigt; Abb. 44). Der δ, ε-freie Salat-CF_1 bildet sowohl mit dem AS '42-t als auch dem AS 152-t deutliche Rockets aus.

Die Aufbewahrung des wässrigen Überstands nach Chloroformextraktion von Salatthylakoiden bei - 20°C resultiert bereits nach einem Tag in einem kompletten Verlust der antigenen Eigenschaften des $\alpha\beta\gamma$-Fragments gegenüber den verwendeten Antiseren (Abb. 44). Eine ähnliche Beobachtung konnte ich auch mit chloroform-extrahiertem CF_1 aus Spinat machen (Abb. 46). Somit sind auch das δ- bzw. das δ, ε-freie Enzym entsprechend dem kompletten Kopplungsfaktor kältelabil [20,22, 110].

4.6. Bindung von δ, ε-freiem Salat-CF_1 an EDTA-behandelte Spinat-Thylakoide

Wie mit dem δ-freien Enzym (Kap. 4.5.) sollte mit dem $\alpha\beta\gamma$-Fragment die Frage nach der Funktion der kleinen Untereinheiten δ und ε geklärt werden. Zunächst soll untersucht werden, wie sich der Verlust beider kleinen Untereinheiten auf die Rückbindung des CF_1-Moleküls an die Thylakoidmembran auswirkt, ob es überhaupt noch bindungsaktiv ist. Entgegen den Erwartungen geht aus Abb. 47 eindeutig hervor, daß das δ, ε-freie Enzym an EDTA-Partikel binden kann. Somit sind im CF_1-Molekül weder δ noch ε für die Bindung essentiell.

Die hier bestimmte rückgebundene $\alpha\beta\gamma$-Menge von 40 µg/50 µg Chl übertrifft den CF_1-Gehalt der unbehandelten Thylakoide (8 µg/50 µg Chl). Es kommt hinzu, daß die EDTA-Partikel sogar noch 17 % Rest-CF_1 enthalten und somit nur für 33 µg CF_1-freie Bindungsstellen aufweisen. Außerdem ist das Molekulargewicht des δ, ε-freien CF_1 auch noch geringer als das eines

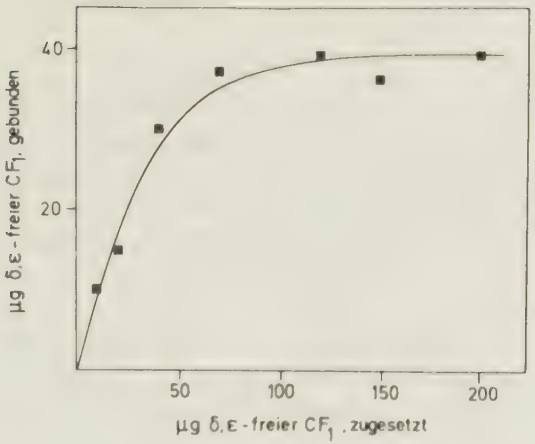


Abb. 47: Bindung von δ,ε-freiem Salat-CF_1 an EDTA-behandelte Spinat-Thylakoide.
0,5ml Ansatz enthalten: Spinat-EDTA-Partikel (50μg Chl, CF_1-Restgehalt: 27%), δ,ε-freien Salat-CF_1 in den angegebenen Mengen und 10mM $MgCl_2$. Nach 15min Inkubation werden die Membranen abzentrifugiert, zweimal gewaschen (Kap. VI.13.) und in 40μl 3% Triton gelöst. Bestimmung des membrangebundenen CF_1 durch EID; AS: anti-CF_1 (Spinat), 40μl 150-4/10ml Gel. Elektrophorese: 18h, 120V, 15°C). CF_1-Rocketlängen: 59,5mm/10μg Chl (unbehandelte Thylakoide), 46mm/10μg Chl (EDTA-behandelte Thylakoide). Die gebundene $\alpha\beta\delta$-Menge wird über eine Eichgerade mit freiem $\alpha\beta\delta$ bestimmt; hiernach gilt: 1μg $\alpha\beta\delta \triangleq$ 6,6mm Rocketlänge. Nach der in Kap. 1.7. beschriebenen Methode wurde gleichzeitig das Chl/CF_1-Verhältnis des verwendeten Spinats bestimmt. Es beträgt: 60 Chl/CF_1, was einem Gewichtsverhältnis von 30μg CF_1/50μg Chl entspricht.

kompletten Enzyms (vorausgesetzt die Untereinheiten-Stöchiometrien von Spinat- und Salat-CF_1 sind identisch), so daß das CF_1/Chl-Verhältnis auf molarer Basis noch größer wird. Somit werden ca. 2 $\alpha\beta\delta$-Fragmente pro freier Bindungsstelle an die Thylakoidmembran gebunden. Die Frage, ob und in welchem Ausmaß diese Bindung spezifisch und CF_1-limitiert ist, kann hier zunächst nicht beantwortet werden.

Aus Zeitgründen sollen die Experimente an dieser Stelle abgebrochen werden. Interessante Probleme wie der Einfluß von δ und/oder ε auf die Bindung und die Rekonstitution der Photophosphorylierung mit einem $\alpha\beta\delta$-Fragment müssen somit vorerst offen bleiben.

IV. DISKUSSION

Das innere Membransystem der Chloroplasten enthält die Komponenten des photosynthetischen Elektronentransportsystems und der ATP-Bildung. Um zu einem Verständnis der Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Bestandteilen zu gelangen, ist ihre chemische und funktionale Charakterisierung und die Kenntnis ihrer molaren Verhältnisse und räumlichen Anordnung zueinander von Bedeutung. Die heterogene Verteilung der einzelnen Komponenten über und entlang der Membran - speziell im exponierten und nicht-exponierten Anteil (28) - ist Gegenstand aktueller Untersuchungen (28,44,67,80). Die Wechselwirkung der Elektronentransportkette mit dem ATP-synthetisierenden System besteht in dem durch die Wasserspaltung und dem Plastochinon/Plastohydrochinon-Redoxsystem produzierten pH-Gradienten über der Thylakoidmembran und dessen energetische Nutzung durch die ATP-Synthase. Der Thylakoidmembran kommen hierbei zwei Aufgaben zu, nämlich (a) der Erhalt einer räumlichen Nähe und bestimmten Anordnung der einzelnen Komponenten, deren Diffusionsmöglichkeit praktisch auf 2 Dimensionen beschränkt bleibt, und (b) die Bildung zweier Kompartimente, für die sie eine Protonenbarriere darstellt.

So unterschiedlich die bisher verwendeten Methoden zur Bestimmung der CF_1-Menge in Thylakoiden sind, so unterschiedlich sind auch die ermittelten Werte (Tab. 20). Einzig die Bestimmungen von STROTMANN et al. (178) und die neueren von FRASCH et al. (60) beinhalten keine Annahmen, die ihre Aussagekraft beeinträchtigen könnten. Mit Hilfe der neuen Bestimmungsmethode für membrangebundenen CF_1 konnten von der Größenordnung her die schon von STROTMANN et al. (178) und FRASCH et al. (60) gefundenen Werte bestätigt werden (Kap. 1.7.). Ein weiterer wesentlicher Aspekt ist aber die hier gezeigte Abhängigkeit des CF_1/Chlorophyll-Verhältnisses in Thylakoiden von der Lichtintensität bei der Anzucht des Spinats. Wesentlich zum einen, weil die von manchen Autoren angenommene Konstanz des CF_1/Chlorophyll-Verhältnisses nicht gegeben ist: So haben HARRIS & SLATER (69) und WITT et al. (199)

Mol CF_1 / Mol Chl	Methode der CF_1-Bestimmung	Bemerkung	Ref.
1/60	Inhibierung der Photophosphorylierung durch Chlor-tributyl-zinn.	Annahme: Hemmung durch 1 Inhibitormolekül pro CF_1.	84
1/100	Elektronenmikroskopie	Heterogene Verteilung von CF_1 nicht berücksichtigt. Identität der Partikel mit CF_1 nicht belegt.	122
1/500	Elektronenmikroskopie	Auswahl der ausgewerteten Membranen.	134
1/620	Bindung von radioaktiv markiertem CF_1 an EDTA-Partikel.	CF_1-Restgehalt der EDTA-Partikel nicht berücksichtigt.	66
1/820	Bestimmung der membrangebundenen und freien ATPase-Aktivität nach EDTA-Behandlung von Thylakoiden.	Annahme: Spezifische ATPase-Aktivität hängt nur von der Reinheit eines CF_1-Präparats ab.	120
1/860	ATPase-Bestimmung nach Pyrophosphatbehandlung von Thylakoiden.	-	178
1/806 -1/980	A. EID nach Pyrophosphatbehandlung von Thylakoiden.	-	60
	B. EID nach $CHCl_3$-Extraktion von Thylak.	$CHCl_3$ extrahiert CF_1 nicht komplett.	

Tab.20: Bisher veröffentlichte molare CF_1/Chlorophyll-Verhältnisse von Thylakoidmembranen aus Spinat.

den von STROTMANN et al. (178) bestimmten Wert verschiedenen Berechnungen zugrunde gelegt. Zum anderen ist in der Variation des CF_1/Chl-Verhältnisses eine Adaptation der Pflanze an ihre Umweltbedingungen zu sehen (28).

Zum Verständnis der Wechselwirkungen zwischen CF_1 und den Elektronentransport-Komponenten bzw. -Ketten wäre die Kenntnis ihrer molaren Verhältnisse von Bedeutung. Ich möchte aber hier nicht dem Fehler verfallen, in der Literatur veröffentlichte Verhältnisse von Redoxkomponenten zu Chlorophyll (31) auf den in dieser Arbeit verwendeten Spinat zu übertragen.

Aus meinen Bestimmungen geht nicht hervor, welche der beiden Komponenten - Chlorophyll oder CF_1 - durch den Lichteinfluß in der Menge reguliert wird. Es ist somit auch nicht klar, ob das höhere Verhältnis von Chlorophyll zu CF_1 in den bei Schwachlicht gezogenen Pflanzen auf eine Vermehrung von Photosystem II-Komplexen, die in den nicht exponierten Bereichen der Grana-Stapel vorkommen (136,150), zurückzuführen ist oder durch eine Vermehrung der "Light-harvesting"-Chlorophylle pro Reaktionszentrum (197).

Wie für die Thylakoidmembran so ist auch für das Verständnis der Funktion des Kopplungsfaktors die Kenntnis der Wechselwirkungen, Anzahl und räumlichen Lage der einzelnen Komponenten (Untereinheiten) von Bedeutung. Wie schon in der Einleitung erwähnt, ist die Anzahl der verschiedenen Untereinheiten pro CF_1-Molekül immer noch ein Streitpunkt (12,113)(siehe auch Tab. 1). Dies trifft insbesondere für die kleinen Untereinheiten δ und ε zu, da - wie bei BAIRD & HAMMES diskutiert (12) - während einer F_1- bzw. CF_1-Präparation ein Verlust der kleinen Untereinheiten stattfinden kann (29,61,68,126,129). Durch Modifizierung der für die CF_1-Bestimmung entwickelten Immuntechnik ergab sich eine Methode zur δ-Bestimmung (Kap. 3.4.). Mit ihrer Hilfe konnte gezeigt werden, daß thylakoidgebundener und der hier verwendete EDTA-extrahierte CF_1 den gleichen δ-Gehalt aufweisen (Tab. 16). Durch eine Absolutbestimmung von δ in einem solchen CF_1-Präparat konnte ein molares δ/CF_1-Verhältnis von 2 ermittelt werden, das somit auch für thylakoidgebundenen CF_1 gilt. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der bisher bestimmten Stöchiometrie von $1\delta/CF_1$ (29,128,130), die aus dem schon diskutierten Grund als Minimalwert aufzufassen ist.

Bestimmungen der δ-Stöchiometrie in Kopplungsfaktoren aus Mitochondrien oder Bakterien führten ebenfalls zu Diskrepanzen. So schlossen einige Autoren (11,39,162,184) aus ihren Ergebnissen auf $1\delta/F_1$ aus Mitochondrien, während SENIOR (164) $2\delta/F_1$ angibt. VOGEL & STEINHART (191) gelangten bei Escherichia coli zu einem Verhältnis von 1 - $2\delta/F_1$, KAGAWA et al. (82) fanden für das thermophile Bakterium PS3 $1\delta/F_1$. In Anbetracht einer möglicherweise unterschiedlichen Funktion

der als δ bezeichneten Untereinheit aus Kopplungsfaktoren verschiedener Herkunft - ein Punkt, der später noch diskutiert werden soll - ist auch eine unterschiedliche δ-Stöchiometrie in verschiedenen Kopplungsfaktoren nicht auszuschließen. Der hier bestimmte Wert von 2δ/Kopplungsfaktor aus Chloroplasten sollte also keinen Anlaß zu Verallgemeinerungen geben.

CF_1 ist derart mit seinem integralen Membranteil (CF_0) verbunden, daß die hierdurch translozierten Protonen streng mit der ATP-Bildung gekoppelt sind. Eine teilweise Ablösung des CF_1 von der Thylakoidmembran führt zu einem völligen Verlust der Photophosphorylierungs-Kapazität (24,111), da mit dem dadurch bedingten Zusammenbruch des pH-Gradienten dem restlichen membrangebundenen CF_1 die energetische Grundlage zur ATP-Synthese entzogen wird. Die Verbindung zwischen CF_0 und CF_1 konnte mit Hilfe der Elektroimmunodiffusion studiert werden, indem Dissoziation und Assoziation des Enzym-Komplexes in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren untersucht wurden. Die hier verwendete Methode der EID zur Bestimmung von CF_1 ist für diese Versuche besonders geeignet, da sie einen direkten Vergleich von membrangebundenem und freiem CF_1 erlaubt. Somit kann durch EID sowohl der Anteil des gebundenen vom zugesetzten CF_1 als auch der Gehalt auf der Thylakoidmembran bestimmt werden (siehe auch Kap. 1.8.). In der Untersuchung von TELFER et al. (182) zur CF_0-CF_1-Bindung diente die Veränderung der Photophosphorylierungs-Kapazität in Abhängigkeit vom zugesetzten CF_1 als Kriterium der CF_1-Rückbindung. Eine solche Methodik ist deshalb ungeeignet, weil die Photophosphorylierungs-Kapazität nicht proportional vom CF_1-Gehalt abhängt (24,66,111). Wie meine Untersuchungen gezeigt haben, kann außerdem nicht davon ausgegangen werden, daß der gesamte zugesetzte CF_1 - trotz freier Bindungsstellen - an die Thylakoidmembran gebunden wird.

Wie schon gezeigt (16) ist die Bindung von CF_1 an CF_0 kationenabhängig. Höher geladene Kationen sind in dieser Hinsicht effektiver als weniger geladene (Tab. 11). So betragen die von mir bestimmten Konzentrationen zur halbmaximalen Rückbindung von CF_1 an Thylakoidmembranen 40mM für Na^+ bzw. 0,9mM

für Mg^{2+}. Zur halbmaximalen Rekonstitution der Photophosphorylierung sind 10mM Na^{+}, 1mM Mg^{2+} bzw. ca. 0,2mM des Tris-äthylendiamin -kobalt^{3+}-Ions notwendig (182). Das unspezifische Verhalten der CF_0-CF_1-Bindung gegenüber Kationen läßt auf deren allgemeine Wirkung schließen. Sie besteht in der Verminderung der Abstoßung zwischen dem negativ geladenen CF_1 und der negativ geladenen Thylakoidmembran (26,146). Die Abschirmung der Ladungen läßt sich aufgrund der beobachteten Phänomene nach der Theorie von GOUY und CHAPMAN durch Erhöhung der positiven Raumladungsdichte in der Nähe der negativen, fixen Ladungen erklären (13). Fazit aus den Versuchen zur Kationen-Abhängigkeit der CF_0-CF_1-Bindung ist - wie schon in Kap. 1.8. diskutiert -,daß bisher nicht identifizierte Kräfte für die CF_0-CF_1-Bindung verantwortlich sind, die mit den elektrostatischen Abstoßungskräften konkurrieren. Diese Abstoßungskräfte treten erst durch eine künstlich herbeigeführte Verarmung an Kationen in Erscheinung. In vivo dürfte Mg^{2+} als Hauptkation der positiven Ladungswolke über der Thylakoidmembran (123) als Stabilisator der CF_0-CF_1-Bindung wirken. In Abb. 15 habe ich versucht, die Ionenwirkungen auf die CF_0-CF_1-Bindung schematisch darzustellen.

Nach dem Modell von BARBER (13) soll die CF_0-CF_1-Bindung durch elektrostatische Anziehung erfolgen, indem eine positiv geladenen Domäne auf der Membran einem negativ geladenen Bereich des CF_1-Moleküls gegenüberliegt. Hierfür gibt es aber keinerlei Evidenzien. Das ausschließliche Vorkommen ionischer Wechselwirkungen erschwert auch die Vorstellung, daß CF_1 den Protonenstrom durch CF_0 blockieren kann. Unter diesem Aspekt wären eher hydrophobe Wechselwirkungen zu fordern. Ein Hinweis auf ihr Vorhandensein ist in der Möglichkeit einer CF_0-CF_1-Dissoziation durch Na-desoxycholat (Kap. 3.4.2.) oder $CHCl_3$ zu sehen (204).

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß unter optimalen Ionenbedingungen ein bis zu fünffacher CF_1-Überschuß notwendig ist, um alle Bindungsstellen in EDTA-Partikeln wieder zu besetzen: Das Gleichgewicht der Rückbindung liegt also auf der Seite des dissoziierten Komplexes. Die gleiche Beobachtung konnte mit Streptococcus-F_1 gemacht werden (1). Bei im gleichen

Ionenmilieu suspendierten frisch präparierten Thylakoiden tritt allerdings keine CF_0-CF_1-Dissoziation auf. Bei Gleichartigkeit der ursprünglichen und wiederhergestellten Bindung müßte sich aber das Gleichgewicht von beiden Seiten her einstellen lassen. Durch Rückbindung von gereinigtem CF_1 an CF_0 ist der ursprüngliche Zustand also wohl nicht komplett restauriert. Hierzu könnte eine bisher nicht identifizierte Komponente notwendig sein. Ihr Fehlen könnte gleichermaßen dafür verantwortlich sein, daß trotz kompletter Besetzung der Membranbindungsstellen mit CF_1 die prozentual rekonstituierte Photophosphorylierung nicht über den prozentualen CF_1-Restgehalt der verwendeten EDTA-Partikel hinausgeht, die Rekonstitution also nur strukturell ist (24). Phosphorylierungs-stimulierende, nicht näher charakterisierte Komponenten sind sowohl aus Chloroplasten (101,102,167) als auch aus Mitochondrien (91) beschrieben worden. Die Erfordernis eines hohen CF_1-Überschusses zur kompletten Besetzung der Membranbindungsstellen könnte auch dadurch erklärt werden, daß ein Großteil des gereinigten Kopplungsfaktors nicht mehr bindungsfähig ist. Diese Möglichkeit wird aber dadurch ausgeschlossen, daß isolierter CF_1 durch einen Überschuß an EDTA-Partikeln komplett aus einer Lösung erschöpft werden kann (Abb. 17).

Die Unterschiedlichkeit der ursprünglichen und rekonstituierten CF_0-CF_1-Bindung manifestiert sich auch in der sehr differierenden Kationenerfordernis zur Verhinderung des EDTA-Effekts (CF_0-CF_1-Dissoziation) bzw. zur Rückbindung von CF_1 (Tab. 11).

Zur Frage eventueller Cofaktoren der CF_0-CF_1-Bindung möchte ich noch einige Anmerkungen machen. Bei der Behandlung von Thylakoiden mit EDTA gehen nicht nur der Kopplungsfaktor sondern auch eine ganze Reihe von Lipiden in Lösung (71,156), die evtl. zur Wiederherstellung der ursprünglichen CF_1-Membranbindung nötig sind. Schon LENAZ (96) diskutiert hydrophobe Interaktionen von F_1 aus Mitochondrien mit Membranlipiden. Nach dem Studium der Protein-Protein-Interaktionen im F_0-F_1-Komplex ist gerade in jüngster Zeit das Problem der Protein-Lipid-Wechselwirkungen mehr in den Vorder-

grund des Interesses gerückt. DIJKMANS & DANIEL (51) fanden, daß die CF_1-Bindung an Proteolipid-komplementierte Vesikel spezielle bisher nicht identifizierte Lipide erfordert. Die richtige funktionale Orientierung der mitochondrialen ATP-Synthase in der Membran ist das Ergebnis von Lipid-Protein-Interaktionen (173), so fördern Phospholipide (141) und ganz speziell Phosphatidylserin (38) die enzymatische Aktivität des F_0-F_1-Komplexes. Die membrangebundenen ATPasen aus Erythrozyten (207) oder dem sarkoplasmatischen Retikulum (192) sind ebenfalls durch Phosphatidylserin stimulierbar. Schließlich ist auch die Aktivität einer Plasmamembran-ATPase aus Rettich phospholipidabhängig (42). Zur Isolierung einer aktiven ATP-Synthase aus Mitochondrien sind DARSZON et al. (47) dazu übergegangen, dieses Enzym mit Hilfe organischer Lösungsmittel als Protein-Lipid-Komplex - also zusammen mit seinen spezifischen "boundary-lipids" zu extrahieren. SANDERMANN (149) gibt einen Überblick über Art und Bedeutung von Protein-Lipid-Interaktionen. Aufgabe der Zukunft wird es sein, die Bedeutung von Lipiden bei der Bindung und enzymatischen Funktion von CF_1 zu studieren.

Die Frage nach der Lokalisierung der CF_0-Bindungsstelle im CF_1-Teil scheint nach den Angaben in der Literatur schon eindeutig geklärt (12,62,113,130,132,166). Hiernach sollen NELSON & KARNY (129) und YOUNIS et al. (204) gezeigt haben, daß die δ-Untereinheit für die CF_0-CF_1-Bindung essentiell ist. Allerdings läßt nur ein äußerst fragwürdiges Experiment bei YOUNIS et al. (204) eine solche Schlußfolgerung zu. NELSON & KARNY (129) haben überhaupt keine Bindung gemessen, sondern nur die rekonstituierte Photophosphorylierung in Abhängigkeit von der zugesetzten δ-Menge.

Da das Experiment von YOUNIS et al. (204) die Ausgangsbasis für meine Untersuchungen war, soll es hier kurz diskutiert werden: Nach Inkubation von 90μg "δ-freiem" bzw. δ-haltigem CF_1 mit steigenden Mengen EDTA-Partikeln (max. 100 μg Chl) und Zentrifugation wurde im Überstand die hitzeaktivierbare ATPase (57) gemessen. Während in den Ansätzen mit δ-freiem CF_1 eine überall gleiche Abnahme der ATPase-Aktivität um ca. 17% ($\hat{=}$ 15μg) gegenüber der Kontrolle verzeichnet

wurde, konnte ab 50µg Chlorophyll und höher in den Ansätzen mit δ-haltigem Protein keine ATPase-Aktivität mehr festgestellt werden. Zu diesen Ergebnissen möchte ich folgende Anmerkungen machen:

a. Bei der günstigen Annahme, daß die von YOUNIS et al. verwendeten EDTA-Partikel nur noch 30% Rest-CF_1 enthalten, und aufgrund der Tatsache, daß 50µg Chl die 90µg δ-haltigen CF_1 komplett binden sollen (ATPase-Akt. im Überstand = 0), kann man eine Stöchiometrie von $1CF_1$/130 Chl berechnen. Dieser Wert widerspricht in extremer Weise meinen Bestimmungen und denen anderer Autoren (Tab. 8, Ref. 60,178). Hält man sich dabei noch vor Augen, daß für eine komplette Rückbindung von CF_1 ein Überschuß an freien Bindungsstellen vorhanden sein muß, so erscheint das Ergebnis um so fragwürdiger.

b. Zur ATPase-Bestimmung durch Hitze-Aktivierung ist eine CF_1-Konzentration von größer als 0,5mg/ml notwendig (57). Die maximale Konzentration in den Überständen von YOUNIS et al. betrug aber nur 0,14mg/ml.

Aufgrund dieser methodischen Mängel und theoretischen Einwände sollte die Bindung von δ-freiem CF_1 an EDTA-Partikel eine erneute Untersuchung Wert sein. Hierbei stellte sich in der Tat heraus, daß CF_1 auch ohne die δ-Untereinheit an CF_0 binden kann, δ also nicht essentiell für die Bindung ist.

In diesem Zusammenhang ist ein wenig beachtetes Ergebnis von SCHOPF & HARNISCHFEGER (158) zu erwähnen, die mit Hilfe von fluoreszenzmarkiertem CF_1 gezeigt haben, daß selbst trypsinbehandelter Kopplungsfaktor an EDTA-Partikel bindet. Eine solche Trypsinbehandlung von CF_1 bewirkt aber einen Verlust der δ-Untereinheit (48). Da SCHOPF & HARNISCHFEGER (158) keine Untereinheiten-Analyse ihres trypsinbehandelten CF_1-Präparats durchgeführt haben, konnten sie allerdings nicht auf eine Bindung von CF_1 ohne δ schließen.

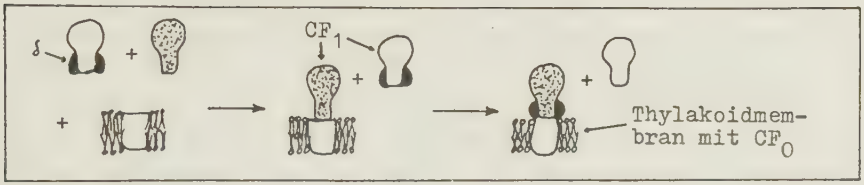
Eine maximale Rückbindung an EDTA-Partikel zu 100% bezogen auf Kontrollpartikel zeigt, daß auch der δ-freie CF_1 spezifisch gebunden wird. Allerdings ist er nicht in der Lage, die Photophosphorylierungs-Kapazität von EDTA-Partikeln zu erhöhen, wie dies etwa mit DCCD durch Abdichtung offener CF_0-Protonenkanäle möglich ist (111,188): δ-freier CF_1 bindet

zwar spezifisch, kann aber weder seine katalytische noch seine strukturelle Funktion wahrnehmen. Hierzu ist die zusätzliche Bindung von δ Voraussetzung: Die Photophosphorylierungs-Kapazität von EDTA-Partikeln nimmt bei kompletter Besetzung der Bindungsstellen durch CF_1 mit steigendem δ/CF_1-Verhältnis auf der Membran zu (Abb. 36, 37). Auch NELSON & KARNY (129) und YOUNIS et al. (204) haben gezeigt, daß zur Rekonstitution der Photophosphorylierung mit δ-freiem CF_1 zusätzliches δ notwendig ist. Da in all meinen Rekonstitutionsversuchen mit δ-freiem CF_1 und δ die rekonstituierte Photophosphorylierungs-Kapazität prozentual nie den Anteil an Rest-CF_1 in den EDTA-Partikeln überschritt, kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob der rückgebundene CF_1 auch wieder katalytisch aktiv wurde (siehe hierzu Ref. 24).

Da δ alleine - trotz kompletter Besetzung seiner Bindungsstellen in EDTA-Partikeln - keinen DCCD-ähnlichen Effekt auf die Abdichtung der Protonenkanäle zeigt (Tab. 19), also den H^+-Strom durch CF_0 unbeeinflußt läßt, gleichzeitig aber in Kombination mit δ-freiem CF_1 eine Abdichtung der Membran bewirkt, ist seine Aufgabe wohl in der Kopplung des Protonenstroms an die ATP-Synthase zu sehen. Somit kann man δ als Kopplungsfaktor im eigentlichen Sinne bezeichnen (110).

Da δ sowohl am CF_1 als auch am CF_0 (Abb. 41) eine Bindungsstelle besitzt, ist es auch an der CF_0-CF_1-Bindung beteiligt. Hierbei scheint es aber nur eine untergeordnete Rolle zu spielen: Die Bindung von δ-freiem und δ-haltigem CF_1 konnte nämlich nicht unterschieden werden. Die Abhängigkeit der Rückbindung von der CF_1-Menge (Abb. 39) sowie die Ionenerfordernis (Abb. 13, 40) und die Kinetik der Rückbindung (Abb. 41) sind für das δ-freie und δ-haltige Enzym identisch. Auch konnte die Bindung des δ-freien CF_1 durch zusätzliche, isolierte δ-Untereinheit nicht gefördert werden (Abb. 37). Zu diesen Beobachtungen steht im Widerspruch, daß δ-haltiger gegenüber δ-freiem CF_1 anscheinend bevorzugt an EDTA-Partikel gebunden wird (Abb. 17, 35). Eine Erklärungsmöglichkeit für dieses Phänomen besteht darin, daß die Bindung von δ unabhängig von der CF_1-Bindung erfolgt, indem diese Untereinheit zwischen freiem δ-haltigem CF_1 und membrangebundenem δ-freiem

CF_1 ausgetauscht werden kann. Durch einen solchen Vorgang wird eine selektive Bindung des kompletten Enzyms vorgetäuscht:



Der Beitrag anderer Untereinheiten zu den Bindungskräften ist also so groß, daß die zusätzlichen δ-Bindungen vernachlässigbar sind. Welche Untereinheit(en) ist (sind) aber für die Bindung verantwortlich? Die Präparation eines δ, ε-freien Proteins sollte diese Frage klären helfen. Wenn - analog zum F_1 aus E. coli - δ und ε für die CF_0-CF_1-Bindung verantwortlich wären (175), dürfte ein nur noch aus α, β und γ bestehender CF_1 nicht mehr an die Membran binden. Abb. 47 zeigt aber, daß auch ein δ, ε-freier CF_1 an seinen CF_0-Teil bindet, somit also zumindest eine der 3 restlichen Untereinheiten (α, β oder γ) direkt mit CF_0 interagieren muß.

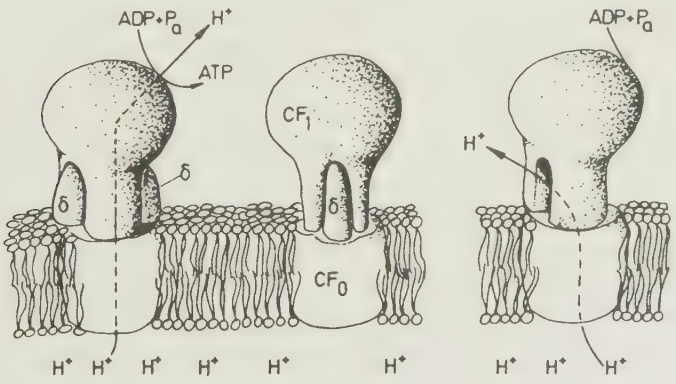


Abb. 48: Schematische Darstellung des membrangebundenen ATP-Synthase-Komplexes. Links: δ-haltiges Enzym, jeweils um 90° gedreht. Rechts: δ-freies Enzym; der Protonenstrom kann nicht zur ATP-Synthese genutzt werden. Welche Untereinheit den Kontakt zum CF_0 herstellt, ist nicht bekannt.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse lassen sich mit dem in Abb. 48 dargestellten Modell der photosynthetischen ATP-Synthase vereinbaren, in dem die beiden δ-Untereinheiten in direkter Verbindung mit dem CF_0-Teil stehen. Da ein Antiserum gegen δ Thylakoidmembranen zwar verzögert, aber direkt agglutiniert (32), muß δ im ATP-Synthase-Komplex noch durch Antikörper erreichbar sein, wird also durch die anderen Untereinheiten nicht vollständig eingeschlossen. Diese Schlußfolgerung steht auch im Einklang mit dem Ergebnis, daß gebundener δ-freier CF_1 die Bindung von δ an die Thylakoidmembran nicht kompetitiv hemmt (nicht gezeigt). Offen ist die Frage, welche Untereinheit(en) für die Bindung an den CF_0-Teil verantwortlich ist (sind).

KOZLOV et al. (89) vermuten, daß γ und δ einen spezifischen Kontakt zwischen F_0 und F_1 aus Mitochondrien herstellen. Bei Streptococcus (3,95) und Mycobacterium phlei (144) soll die α-Untereinheit direkt mit dem integralen F_0-Teil oder wie bei E. coli (36) mit den Phospholipiden der Membran interagieren. Da - wie noch gezeigt wird - Analogieschlüsse nur mit Vorbehalt gezogen werden dürfen, sollen die aufgezählten Befunde mit mitochondrialen bzw. bakteriellen Kopplungsfaktoren nur Lösungsmöglichkeiten für das spezielle Problem der CF_0-CF_1-Bindung darstellen. Hierzu ist bekannt, daß ein αβ-Fragment von CF_1 nicht zur Bindung an CF_1-verarmte Thylakoide befähigt ist (48). Wie hier gezeigt (Abb. 47), bindet aber ein αβγ-Fragment. Somit könnte die γ-Untereinheit das Bindungsprotein darstellen. Die Präparation von CF_1-Molekülen, denen bestimmte Untereinheiten fehlen, mag in Kombination mit Bindungsversuchen hierüber Aufschluß geben. Wenn aber wie bei E. coli die γ-Untereinheit für die Assoziation von α und β notwendig ist (93), wird dieser Weg nicht gangbar sein. Es ist nämlich nicht klar, ob das schon erwähnte von DETERS et al. (48) präparierte αβ-Fragment wirklich γ-frei ist. So konnte in einem ebenfalls durch Trypsinbehandlung gewonnenen αβ-Enzym aus E. coli noch ein γ-Teilstück mit Hilfe immunologischer Methoden nachgewiesen werden (172). Übrig bleibt dann die Rekonstitution des CF_1-Teils an der Membran durch die isolierten Untereinheiten, wie schon für andere

Kopplungsfaktoren durchgeführt (53,63,181,191,201,202). Daß ein solches Vorhaben keinesfalls als ein bloßes "Nachkochen" bereits durchgeführter Versuche abzuwerten ist, mögen die folgenden Ausführungen verdeutlichen.

Schon BAIRD & HAMMES (12) äußerten, daß die Funktionen besonders der kleinen Untereinheiten δ und ε in ATPasen unterschiedlicher Herkunft nicht analog sein müssen (Tab. 21). Hierfür liefern meine Untersuchungsergebnisse weitere Bestätigung. Während bei E. coli und dem Bakterium PS3 die δ-Untereinheit essentiell für die Bindung von F_1 an F_0 ist (61, 171,175,201), konnte dies für F_1 aus Mitochondrien bisher nicht bestätigt werden. Wie hier gezeigt, ist die δ-Untereinheit aus CF_1 für die Bindung nicht nötig. Dies gilt gleichermaßen für die ε-Untereinheit aus CF_1 (Abb. 47) und mitochondrialem F_1 (175). Für die Bindung von F_1 aus Bakterien ist ε wiederum essentiell (148,175,201).

Die Funktion von ε als ATPase-Inhibitor ist vom Kopplungsfaktor aus Chloroplasten und E. coli bekannt (124,171), ε aus Mitochondrien-F_1 bzw. TF_1 besitzt keine Inhibitorwirkung (164, 202). In Mitochondrien konnte diese Aufgabe einem zusätzlichen Peptid zugeordnet werden (40,49,160). Letztendlich beschreiben YOUNIS et al. (205) einen mit der ε-Untereinheit nicht identischen ATPase-Inhibitor aus Chloroplasten.

Die Abwesenheit von Tryptophan in mitochondrialem F_1 (138), CF_1 (56,206) und Kopplungsfaktor aus Rhodospirillum rubrum (23) wurde aus Fluoreszenzmessungen geschlossen. Die Ergebnisse von Aminosäure-Analysen mit den isolierten CF_1-Untereinheiten (124,125,129) implizieren ebenfalls ein Fehlen von Tryptophan. Aus den zitierten Arbeiten geht aber nicht hervor, ob ein spezieller, notwendiger Analysengang für Tryptophan überhaupt durchgeführt wurde und es dabei nicht gefunden werden konnte. Sich auf die "bewiesene" Abwesenheit von Tryptophan berufend erachten BINDER et al. (29) in ihren Aminosäure-Analysen eine gesonderte Tryptophan-Bestimmung als überflüssig. Somit gilt hier als Dogma, was in Wirklichkeit nicht bewiesen wurde: CF_1 enthält kein Tryptophan. Eigene Fluoreszenzmessungen (Abb. 43) liefern aber Hinweise auf das Vorkommen von Tryptophan im CF_1. So kann zwar im intakten CF_1-Molekül

Funktion/Eigenschaft	δ-Untereinheit aus				ε-Untereinheit aus				OSCP	F_6
	Chloropl.	Mitoch.	E. coli	PS3	Chloropl.	Mitoch.	E. coli	PS3		
Für die Bindung von F_1 an die Membran essentiell	− Kap. 4.2.	?	+ (61,175)	+ (83)	− Kap. 4.6.	?	+ (175)	+ (83)	− (145) + (164)	+ (86)
Für die ATP-Synthase-Aktivität essentiell	+ Kap. 4.2. (129,204)	?	+ (170, 174)	+ (83)	?	?	+ (53,175)	+ (83)	+ (143)	+ (143)
Inhibiert die ATPase-Aktivität					+ (124)	− (164)	+ (133,171, 177)	− (202)		
Bindet allein spezifisch an F_1-verarmte Membranen	+ Kap. 4.3.	?	− (176)	+ (201)	?	?	− (175)	+ (201)	+ (186)	?
Kreuzvernetzbar mit	α,β (10)	ε (11,184)	α (35)	?	α,β,γ (10)	γ,δ (11,184)	β,γ (35)	?	α,β (53)	?
Verbunden mit	?	?	α (54)	?	?	α oder β (88)	γ (93)	?	?	?
Wird im Zellkern kodiert	+ (33,196)	+ (106,151, 152)			− (33,196)	+ (106,151, 152)			+ (187)	?
Molekulargewicht (kd)	17,5-21 (114,125)	13-17,3 (87,165)	18-18,5 (174, 198)	15,5 (200)	13-14 (114,125)	5,7 - 8 (87,165)	16 (198)	11 (200)	18 - 23 (45,165)	8 (45)
Enthält Tryptophan	− (129,139)	− (139)	+ (174)	+ (203)	+ Kap. 4.5. (15)	− (139)	− (177)	+ (203)	?	?
Anteil α-Helix	?	?	60% (105)	65% (203)	?	?	40% (177)	33% (203)	?	?
Form	abgeflachter Ellipsoid a=12,5 Å b=14 Å c=45 Å (154)	?	länglich (174)	?	abgeflachter Ellipsoid a=12,7 Å b=12,7 Å c=25,4 Å (153)	?	?	?	?	?

Tab. 21: Eigenschaften und Funktionen der δ- bzw. ε-Untereinheit aus Kopplungsfaktoren verschiedener Herkunft sowie der OSCP- und F_6-Untereinheit der mitochondrialen ATP-Synthase. Es wird auf entsprechende Kapitel aus dieser Arbeit bzw. auf Literaturstellen (in Klammern) verwiesen.

keine Tryptophan-Fluoreszenz nachgewiesen werden, die isolierte ε-Untereinheit zeigt aber eine typische Tryptophan-Emission. Sie wird auch nach Dissoziation von CF_1 in 7 M Harnstoff sichtbar. Im nativen CF_1 mag die Position von Tryptophan ein Quenchen der Fluoreszenz zur Folge haben. Kurz vor Abschluß dieser Arbeit wurde der Tryptophan-Gehalt der ε-Untereinheit aus CF_1 von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt (15). Für sich betrachtet mag dieses Problem zunächst nur geringe Bedeutung haben. Das ändert sich aber, wenn aus der bewiesenen Tryptophan-Freiheit von F_1 und CF_1 Schlüsse gezogen werden. So sieht HARRIS (70) in dieser Tatsache einen Hinweis auf das frühe Entstehen des mitochondrialen und plastidären Kopplungsfaktors in der Evolution.

Die vergleichenden Betrachtungen (Tab. 21) von Eigenschaften und Funktionen der δ- und ε-Untereinheiten aus verschiedenen Kopplungsfaktoren bestätigen mehr und mehr die Vermutung, daß gleichbezeichnete Untereinheiten aus ATPasen verschiedener Herkunft nicht unbedingt homolog sein müssen, eine Tatsache, die eine Quelle der bestehenden Diskrepanzen sein dürfte. Betrachtet man Eigenschaften und Funktionen der als OSCP bezeichneten Proteinkomponente des Kopplungsfaktors aus Mitochondrien (Tab. 21), so stellt man große Übereinstimmung mit der δ-Untereinheit aus CF_1 fest. Vielleicht sind also CF_1-δ und F_1-OSCP phylogenetisch homolog. Ursprung und Funktion der δ-Untereinheit aus F_1 wären somit unklar.

NELSON (132) nimmt an, daß Kopplungsfaktoren ursprünglich aus 6 verschiedenen Untereinheiten α, β, γ, δ, ε und ε' bestehen. Nachgewiesen sind alle 6 Untereinheiten nur beim mitochondrialen Kopplungsfaktor. CF_1 enthält die ε-Untereinheit, die die Funktion eines ATPase-Inhibitors hat; die kleinste Untereinheit des F_1 aus E. coli soll nach NELSON das ε' darstellen. Es soll für die Bindung des Kopplungsfaktors an die Membran verantwortlich sein. Interessanterweise haben aber gerade die von NELSON (132) so mühsam auseinanderdividierten Untereinheiten ε aus CF_1 und ε' aus F_1 zwei auffallende Gemeinsamkeiten: Sie inhibieren beide die nicht membrangebundene ATPase (75,124,142) und sind stark basisch (Kap. 4.5.2., Ref. 87). Als möglicher Kandidat des ε' in der photosynthe-

tischen ATP-Synthase wird von NELSON (132) die Untereinheit I des CF_0-Teils betrachtet. Vielerlei Spekulationen, die einer unbedingten Klärung bedürfen!

Zusätzlich zu diesen nomenklatorisch bedingten Schwierigkeiten deuten die Angaben aus Tab. 21 aber auch daraufhin, daß die verschiedenen ATPasen trotz vieler Gemeinsamkeiten eine spezifische Differenzierung in der Evolution erfahren haben. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, daß die δ-Untereinheit aus CF_1 von relativ nah verwandten Taxa wie Spinat und Salat so unterschiedlich strukturiert ist, daß verschiedene Antiseren gegen Spinat-δ nicht mit Salat-δ kreuzreagieren (146, Kap. 3.3.): Ein Phänomen, das den bisherigen Erfahrungen widerspricht. Nach DICKERSON (50) sollen nämlich gerade solche Proteine, die spezifische Kontaktflächen zu weiteren Komponenten besitzen - wie dies für δ der Fall ist - im Laufe der Evolution nur möglichst langsam Veränderungen erfahren. Ausbleibende Kreuzreaktionen sind also bei Homologie-Untersuchungen mit Vorsicht zu bewerten (siehe hierzu auch 18, 25). Erwähnt sei noch, daß sich auch die Molekulargewichte der CF_1-Untereinheiten aus Spinat und Salat unterscheiden (Abb. 46).

Aminosäuren- und Basensequenzuntersuchungen, wie für die δ-Untereinheit von E. coli durchgeführt (105), werden die angeschnittenen Homologie-Fragen klären helfen. Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse zur Feinstruktur der ATP-Synthasen aus verschiedenen Organellen bzw. Organismen verschiedener systematischer Kategorien liefern sicherlich auch weitere Aspekte zur Symbionten-Theorie (108,193). Endergebnis mag sein, daß die für Kopplungsfaktoren verschiedener Herkunft beschriebenen Modelle (CF_1: Abb. 55, F_1 aus Mitochondrien: Ref. 164,184,185; ECF_1: Ref. 43, 175; TF_1: 201) zum Teil nebeneinander bestehen können und nicht widersprüchlich zueinander sind: Die Evolution hat eben auch nicht vor den Kopplungsfaktoren halt gemacht.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der strukturellen und funktionalen Interaktion des peripheren CF_1-Teils der photosynthetischen ATP-Synthase mit seinem hydrophoben Membranteil CF_0. Für diese Untersuchungen werden neue immunchemische Methoden zur quantitativen Bestimmung von CF_1 und seiner δ-Untereinheit vorgestellt. Sie lassen einen direkten quantitativen Vergleich der Proteine in löslicher und membrangebundener Form zu (Kap. 1 und 3.4.).

Die Untersuchung des CF_1/Chlorophyll-Verhältnisses in Thylakoiden ergab seine Abhängigkeit von der Lichtintensität bei der Anzucht der Pflanzen.(Tab. 8). Mit der Änderung des CF_1-Gehalts ist die Photophosphorylierungs-Kapazität der Membranen direkt korreliert. Unter (somit) enzymlimitierten Bedingungen konnte die Umsatzgeschwindigkeit eines CF_1-Moleküls zu 1 ATP/4 msec bestimmt werden.

Durch Verarmung an ein- und mehrwertigen Kationen wird die CF_0-CF_1-Bindung pH-empfindlich (Abb. 10): Unterhalb pH 6,5 wird kein CF_1 von der Membran abgelöst; eine maximale Dissoziation wird bei pH 7,2 erreicht (80%). Diese pH-Sensibilität kann durch verschiedenste ein- und zweiwertige Metallionen wieder aufgehoben werden (Abb. 11, 12; Tab. 9). Die Funktion der Kationen wird in der Stabilisierung der CF_0-CF_1-Bindung durch Abschirmung negativer Oberflächenladungen gesehen. Die eigentliche Bindung ist wahrscheinlich auf hydrophobe Wechselwirkungen zurückzuführen (Abb. 30).

Bei der Rückbindung von CF_1 an EDTA-Partikel wird maximal der CF_1-Gehalt der unbehandelten Thylakoide wieder erreicht (spezifische, CF_0-limitierte Bindung)(Tab. 10). Zur kompletten Besetzung der freien Bindungsstellen ist aber ein CF_1-Überschuß notwendig. Die halbmaximal wirksamen Kationenkonzentrationen zur CF_1-Rückbindung liegen höher als die zur Verhinderung der CF_0-CF_1-Dissoziation durch EDTA (Tab. 11). In Verbindung mit der Tatsache, daß trotz Besetzung aller Bindungsstellen die Photophosphorylierung von EDTA-Partikeln

nur zu einem geringen Prozentsatz rekonstituiert werden kann, wird diskutiert, daß bei der Reinigung von CF_1 bindungs- und/oder photophosphorylierungs-stimulierende Komponenten verloren gehen.

Mit Hilfe Untereinheiten-defizienter CF_1-Moleküle, isolierter Untereinheiten und den neuen Bestimmungsmethoden für CF_1 und δ wird versucht, die Funktion von δ und ε - wie ihre Beteiligung an der CF_0-CF_1-Bindung - zu klären. Zur Isolierung von δ-freiem CF_1, δ und ε werden die herkömmlichen Methoden modifiziert (Kap. 3.1., 3.2. und 4.5.1.). Eine neue Methode zur Herstellung eines δ, ε-freien CF_1 wird vorgestellt (Kap. 4.5.3.).

Die Untereinheiten-defizienten "CF_1-Species" können mit Hilfe der EID bestimmt werden. Die isolierte ε-Untereinheit zeigt eine typische Fluoreszenz-Emission des Tryptophans (Abb. 43), die aber nicht mit intaktem CF_1 beobachtet werden kann. Sie tritt erst nach Dissoziation des CF_1-Moleküls in Erscheinung.

Mit Hilfe der EID (es wurden 2 δ-Antiseren hergestellt und charakterisiert, Kap. 3.3.) wird die Anzahl der δ-Untereinheiten im isolierten Kopplungsfaktor zu $2\delta/CF_1$ bestimmt (Kap. 3.4.5.). Da Thylakoide das gleiche relative δ/CF_1-Verhältnis aufweisen wie EDTA-extrahierter CF_1 (Tab. 16), gilt die bestimmte Stöchiometrie auch für membrangebundenen CF_1. Chloroform-extrahierter CF_1 weist ein δ-Defizit von 60 - 90% auf.

Die Bindungs- und Rekonstitutionsversuche mit δ- und δ,ε-freiem CF_1 und den isolierten Untereinheiten liefern folgende Ergebnisse:

1. δ-freier CF_1 wird spezifisch an EDTA-Partikel gebunden. Zur Bindung von CF_1 an CF_0 ist also kein δ notwendig (Abb. 35 - 37).
2. Die Bindung des δ-freien Enzyms bewirkt keine Erhöhung der Photophosphorylierungs-Kapazität in EDTA-Partikeln (Abb. 37), vermindert also die Protonen-Permeabilität der Thylakoidmembran wohl nicht.
3. Durch Bindung von δ-freiem CF_1 und zusätzlicher δ-Untereinheit wird die Photophosphorylierungs-Kapazität der

EDTA-Partikel erhöht (Abb. 36, 37). Hierbei wird maximal der CF_1- und δ-Gehalt der unbehandelten Thylakoide erreicht. Die Funktion von δ entspricht der eines Kopplungsfaktors.

4. δ bindet allein spezifisch an CF_1-verarmte Thylakoide (Abb. 38). Dabei läßt es die Photophosphorylierungs-Kapazität der EDTA-Partikel unbeeinflußt (Tab. 19).
5. Isolierte δ-Untereinheit stimuliert die Bindung von δ-freiem CF_1 an EDTA-Partikel nicht (Abb. 37).
6. Läßt man δ-haltigen und δ-freien CF_1 um Bindungsstellen auf der Thylakoidmambran konkurrieren, so wird anscheinend das δ-haltige Enzym bevorzugt gebunden (Abb. 17, 35).
7. Trotz selektiver Bindung des δ-haltigen CF_1 gegenüber δ-freiem kann kein Unterschied in der Bindung beider "CF_1-Species" gefunden werden:
   a. Identische Proteinabhängigkeit (Abb. 39)
   b. Identische Bindungskinetik (Abb. 41)
   c. Identischer Kationenbedarf (Abb. 40)
8. δ,ε -freier CF_1 ist immer noch fähig, an EDTA-Partikel zu binden (Abb. 47), d.h.: Weder δ noch ε sind für die CF_0-CF_1-Bindung essentiell.

Im Vergleich mit Kopplungsfaktoren aus Mitochondrien oder Bakterien wird diskutiert, daß bisher gleichbenannte Untereinheiten nicht unbedingt phylogenetisch homologe Proteine darstellen müssen. Hierfür sprechen unterschiedliche Eigenschaften und Funktionen der Untereinheiten. Möglicherweise besitzen Kopplungsfaktoren verschiedener Herkunft eine differierende Struktur und Untereinheitenzusammensetzung (Tab. 21).

VI. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien waren vom Reinheitsgrad p. A. und stammten von der Fa. MERCK, außer: PMS, BSA, Coomassie Brilliant Blue G 250, Acrylamid, Na-desoxycholat und Triton (reinst) von SERVA; ATP und ADP von BOEHRINGER; N,N-Methylen-bis-acrylamid und Ammoniumheptamolybdat von FLUKA; Agarose und DTT von SIGMA.

2. Versuchspflanzen

Spinat (Spinacia oleracea L.) wurde in Klimakammern bei einem Licht - Dunkel - Wechsel von 13 h : 11 h, einer Lichtintensität von ca. 10000 Lux (wenn nicht anders angegeben) und einer Temperatur von 17 - 20° C angezogen. Der verwendete Salat (Lactuca sativa capitata (L.) ALEF.)stammt vom Markt oder aus Kaufhäusern.

3. Isolierung von Chloroplasten - Lamellarsystemen aus Spinat und Salat

Für die Bindungsversuche werden ca. 30 g Spinatblätter oder die grünen Blätter eines Salatkopfes in 100 ml Homogenisierungsmedium ca. 10 sec im Braun-Mixer bei Stufe III zerkleinert. Das Homogenisierungsmedium besteht aus 400 mM Saccharose, 20 mM Tricin pH 7,8, 10 mM NaCl und zusätzlich 40 mM Na-Askorbat zur Isolierung aus Salat. Nach Filtration durch 4 Lagen Gaze zentrifugiert man 10 min bei 3000 g und 4° C, der Überstand wird verworfen und das Sediment in 40 ml 10 mM NaCl suspendiert. Danach wird 10 min bei 17000 g (4° C) zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgegossen und das Sediment in wenig 10 mM NaCl sorgfältig resuspendiert. Diese Suspension dient als "Stammlösung" für die durchzuführenden Versuche.

4. Chlorophyllbestimmung (nach ARNON, 6)

Zu 0,08 ml der Chloroplasten-Suspension werden 10 ml 80 %-iges Aceton pipettiert, kräftig geschüttelt und 5 min in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Im Photometer werden die OD_{645} und OD_{740} des klaren Überstandes gegen Aceton bestimmt. Die Chlorophyllkonzentration errechnet sich daraus wie folgt:

$$mg\ Chl/ml = 5x(OD_{645} - OD_{740})$$

5. Herstellung CF_1 - verarmter Thylakoide

5.1. EDTA - Behandlung

Die nach VI.3. hergestellten Thylakoidmembranen werden mit 10 mM NaCl auf 2 mg Chl/ml eingestellt und dann mit 0,75 mM EDTA auf 0,1 mg Chl/ml verdünnt. Unter ständiger Kontrolle und Einstellung des pH - Wertes auf 7,2 (mit verdünnter NaOH) rührt man die Suspension 10 min bei Raumtemperatur. Hierbei werden ca. 80 % des CF_1 von der Membran abgelöst (24, 146). Zur Isolierung von Thylakoiden mit einem CF_1- Gehalt >20 % genügt die Anwesenheit geringer zusätzlicher Na^+- Konzentrationen während der EDTA-Behandlung. Hier einige Richtwerte:

Membrangebundener CF_1	mM NaCl
50 %	+ 2
70 %	+ 3
85 %	+ 4

Nach der EDTA - Behandlung wird 10 min bei 27000 g zentrifugiert (4° C), der Überstand sehr vorsichtig abgegossen und das Sediment in wenig 10 mM NaCl aufgenommen. Zur schnellen, ungefähren Einstellung der Chlorophyllkonzentration wird die Suspension in einem graduierten Zentrifugenglas bei bekannter Chlorophyllmenge auf ein bestimmtes Volumen verdünnt (für die Bindungs- und Rekonstitutionsversuche wird auf 1 mg Chl/ml eingestellt). Eine exakte Chlorophyllbestimmung erfolgt bei Rekonstitutionsversuchen nach Durchführung der Phosphorylierungsreaktion, bei Bindungsversuchen nach Auflösung der Thylakoide in Triton (Kap. VI.13.).

5.2. Pyrophosphat - Behandlung (modifiziert nach STROTMANN et al., 178)

Ausgehend vom Blattmaterial verfährt man wie bei der Isolierung von Thylakoidmembranen (siehe VI.3.). Das Homogenisierungsmedium besteht allerdings hier aus 300 mM Saccharose und 10 mM $Na_4P_2O_7$. Zur Resuspension nach der 1. Zentrifugation wird 10 mM $Na_4P_2O_7$ verwendet. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 17000 g (10 min, 4° C) nimmt man das Sediment in 5 mM $Na_4P_2O_7$ auf und zentrifugiert erneut bei 17000 g ab. Nach diesen M^{2+}-komplexierenden Schritten werden die Lamellarsysteme in für die weiteren Untersuchungen geeigneten Lösungen aufgenommen (siehe III.2.2.).

Vor der letzten Zentrifugation wurde das Sediment - im Gegensatz zu den Angaben bei STROTMANN et al. (178) - in 5 mM statt 10 mM $Na_4P_2O_7$ suspendiert, um den Na^+-Gehalt im letzten Sediment möglichst gering zu halten. 5 mM $Na_4P_2O_7$ entsprechen 20 mM Na^+, die im M^{2+}- verarmten Medium noch eine CF_1- Ablösung von der Membran verhindern können.

6. Isolierung von CF_1 durch EDTA - Extraktion

Die Präparation erfolgt nach der Methode von LIEN & RACKER (97). Die Chloroplasten-Thylakoide werden wie in VI.3. beschrieben isoliert. In Abwandlung zu LIEN & RACKER werden aber die Membranen nach der letzten Zentrifugation nicht in 10 mM NaCl aufgenommen, sondern gleich in 0,75 mM EDTA. Hierdurch wird die Na^+-Konzentration im Extraktionsmedium erniedrigt und damit die Effektivität der EDTA - Behandlung erhöht. Ständiges Nachstellen des pH - Wertes auf 7,2 - 7,5 ist für eine optimale CF_1 - Ablösung gleichfalls erforderlich (ROOS & BERZBORN, in Vorb.). Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration zur Reinigung von CF_1 aus dem Rohextrakt werden nach LIEN & RACKER durchgeführt. Der gereinigte CF_1 wird als Suspension in 50 % $(NH_4)_2SO_4$ bei 4^o C aufbewahrt.

7. Isolierung von δ - freiem CF_1 durch Chloroform - Extraktion (modifiziert nach YOUNIS et al., 204)

Thylakoidmembranen aus Spinat werden wie unter VI.3. isoliert. Nach der ersten Zentrifugation wird das Sediment in 10 mM NaCl + 2 mM Tricin - NaOH pH 8 aufgenommen und 20 min bei 4^o C inkubiert, erneut zentrifugiert und in 250 mM Saccharose, 10 mM Tris - SO_4 (pH 7,6), 1 mM EDTA, 2 mM ATP und 5 mM DTT resuspendiert, so daß eine Chlorophyllkonzentration von 2,5 - 3,0 mg/ml erhalten wird. Diese Suspension wird mit dem halben Volumen an $CHCl_3$ versetzt, 15 s geschüttelt und dann 10 min bei 800 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der wässrige Überstand wird vorsichtig abgehoben und noch enthaltene Membranteile werden durch Zentrifugation abgetrennt (30 min, 12000 g, Raumtemp.). Durch Druckfiltration über Amicon XM 100 (Abscheidegrad 100000 d) bei ca. 2 atü wird der erhaltene goldgelbe Überstand auf 2 - 3 ml eingeengt und einer Gelfiltration über Sephadex G200 oder besser Sephacryl S300 unterworfen.

(Säulenabmessungen: L = 80 cm, ⌀ = 1,5 cm, Äquilibrierungs- und Elutionspuffer: 40 mM Tricin + 2 mM EDTA oder 100 mM NaCl + 20 mM Tricin pH 7,8) Es werden Fraktionen zu 3 ml aufgefangen und zunächst deren OD_{280} gegen Elutionspuffer bestimmt. Weitere Analysen sind SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese, CF_1 - Bestimmung durch Elektroimmunodiffusion, Proteinbestimmung (103) und evtl. Messung der ATPase - Aktivität (57). Die CF_1 - Fraktionen werden vereinigt und durch Ionenaustauschchromatographie über DEAE - Sephadex A 50 weiter gereinigt, wie für EDTA - extrahierten CF_1 bei LIEN & RACKER (97) angegeben.

Das auf diese Weise gewonnene CF_1 - Präparat enthält im Gegensatz zu den Angaben von YOUNIS et al. (204) noch δ, ist also ein Gemisch aus δ - freiem und δ - haltigem Enzym. Nach der in Kap. III.3.1. beschriebenen Methode ist aus einem solchen Präparat die Abtrennung des δ - haltigen CF_1 möglich.

8. Isolierung von δ,ε - freiem CF_1

Isoliert man nach der unter VI.7. beschriebenen Methode CF_1 aus Salat - Thylakoiden, so erhält man nach der $CHCl_3$- Extraktion und den Zentrifugationen einen goldgelben Überstand, der ein δ,ε - freies Enzym und dissoziierte ε - Untereinheit enthält. Beide Komponenten sind leicht über eine Sephacryl S 300 - Säule (wie in VI.7. beschrieben) trennbar. Das so zu erhaltende $\alpha\beta\gamma$ - Fragment besitzt hohe Reinheit und ATPase - Aktivität (siehe Kap. III.4.5.3.). δ - freier und δ,ε - freier CF_1 werden wie komplettes Enzym als Suspension in 50 % Ammoniumsulfat gelagert.

9. Zur Isolierung von δ und ε siehe Kap. III.3.2. bzw. 4.5.1.

10. Säurefällung von CF_1 nach McKINNEY et al. (115)

Nach YOUNIS et al. (204) hergestellter CF_1 - Extrakt wird tropfenweise mit 0,1 M Essigsäure bis pH 5,2 titriert, danach mit 0,5 M HCl bis zu einem pH von 4,7. Hierbei wird der CF_1 ausgefällt (IEP = 4,7).

11. Entsalzen eines Ammoniumsulfat - gefällten CF_1 - Präparats

Die benötigte Proteinmenge wird abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge) und in möglichst wenig (ca. 0,3 ml) 40 mM Tricin pH 7,8 + 2 mM EDTA gelöst. Die Trennung des Ammoniumsulfats vom Protein erfolgt durch Gelfiltration über Sephadex G 50 (Säulenabmessungen: L. 15 cm, ∅ 1 cm; Äquilibrierungs- und Elutionspuffer: 40 mM Tricin pH 7,8 + 2 mM EDTA). 2,5 ml Vorlauf werden verworfen und dann ca. 20 Fraktionen zu 10 Tropfen aufgefangen. Die Anwesenheit von Protein in den einzelnen Fraktionen wird mit der Blasenmethode getestet (Schaumbildung durch vorsichtiges Einblasen von Luft). Die Abtrennung des Ammoniumsulfats wird mit Hilfe von Neßler's Reagenz überprüft, indem von hinten beginnend die Fraktionen mit einem Tropfen Reagenz versetzt werden, bis keine Braunfärbung durch ausfallendes NHg_2J mehr auftritt. Die Proteinfraktionen werden vereinigt und die Proteinkonzentration nach LOWRY et al. (103) bestimmt.

12. Proteinbestimmung

Sie erfolgt nach LOWRY et al. (103) mit BSA als Standard.

13. Bindung von CF_1 und/oder δ an EDTA - Partikel

Es wird mit kleinen Volumina von 0,5 ml gearbeitet. Enthalten sind in der Regel 50 μg Chlorophyll (Kontroll- und EDTA - Partikel) und je nach Aufgabenstellung unterschiedliche CF_1, δ - oder Kationenkonzentrationen. Unter nicht bindungslimitierenden Ionenbedingungen beträgt die eingesetzte Mg^{2+}- Konzentration 10 mM. Bei Titrationen mit verschiedenen CF_1- und δ - Mengen werden die hierdurch entstehenden Unterschiede in den Pufferkonzentrationen ausgeglichen. Gestartet wird die Bindungsreaktion durch Einpipettieren der EDTA - Membranen, dann wird 15 min bei Raumtemp. und wiederholtem Schütteln inkubiert und danach ca. 30 s zentrifugiert (Eppendorfzentrifuge). Die Überstände werden je nach Fragestellung für Analysen (z.B. durch EID) aufbewahrt oder verworfen, die Sedimente 2 x mit 0,3 ml einer Lösung gewaschen, deren Ionenzusammensetzung der des Inkubationsmediums entspricht und erneut zentrifugiert. Die Überstände werden sorgfältig und möglichst quantitativ abgesaugt und das Sediment bei einer eingesetzten Chlorophyllmenge von 50 μg mit 40 μl

3 % Triton X - 100 versetzt. Auf einem Schüttler werden so die Membranen gelöst.

Mit dieser Lösung werden je nach Aufgabenstellung folgende Analysen durchgeführt:

a. Chlorophyllbestimmung (obligat): 16 µl der Lösung werden mit 2 ml 80 % Aceton versetzt (weiter siehe VI.4.).
b. CF_1 - Bestimmung: 6 µl der Lösung werden nach vorheriger Zentrifugation (unlösliche Stärke) direkt in der EID analysiert.
c. δ - Bestimmung: 20 µl Lösung werden mit 4 µl 3 % Triton + 4,8 % DOC ca. 1 h inkubiert. Hiervon können je 6 µl in der EID sowohl für die CF_1- als auch die δ - Bestimmung eingesetzt werden.

14. Rekonstitution der Photophosphorylierung in EDTA - Partikeln mit CF_1 und/oder δ

In 0,5 ml Rekonstitutionsansatz sind enthalten: 20 mM Tricin - NaOH, pH 7,8, 20 mM ATP, 20 mM EDTA, 10 mM $MgCl_2$, 0,2 % BSA, 50 µg Chlorophyll (Kontroll- bzw. EDTA - Partikel) und CF_1 bzw. δ in den jeweils angegebenen Konzentrationen. Gestartet wird die Rekonstitution durch Pipettieren der EDTA - Partikel. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemp. und öfterem vorsichtigem Schütteln werden für Doppelbestimmungen je 100 µl der Suspension in die vorbereiteten Phosphorylierungsansätze pipettiert (siehe nächster Abschnitt). Zur Chlorophyll-, CF_1- und δ-Bestimmung werden die restlichen 0,3 ml abzentrifugiert, die Überstände für Analysen aufbewahrt und die Sedimente jeweils in 30 µl 3 % Triton +0,8 % DOC gelöst (1 h Inkubation). Die Bestimmungen werden wie unter VI.13. angegeben durchgeführt. Sollen auch die Überstände auf CF_1 und/oder δ mit der EID analysiert werden, so werden sie entsprechend dem Detergenzgehalt der Membranlösungen auf 3 % Triton + 0,8 % DOC gebracht.

15. Zyklische Photophosphorylierung mit PMS nach AVRON (8)

1 ml Phosphorylierungsansatz enthält folgende Substanzen: 50 mM Tricin-NaOH pH 8,5, 50 mM NaCl, 3 mM ADP-NaOH pH 7,2, 5 mM $MgCl_2$, 0,1 % BSA, 2 mM Na-askorbat, 2 mM Na-phosphat-Puffer pH 8,0 mit ca. 1-2 µCi ^{32}P, 10 µg Chlorophyll/ml und 0,1 mM PMS. Nach Pipettieren des PMS werden die Ansätze 1 min bei 20° C im

Wasserbad vorinkubiert und exakt 1 min mit sättigendem Rotlicht ($17{,}5 \cdot 10^5$ erg/cm^2·s) bestrahlt. Hierzu wird ein Rotfilter RG 610 nm der Fa. SCHOTT verwendet. Die Reaktion wird möglichst schnell mit der im folgenden Abschnitt beschriebenen Lösung abgestoppt.

16. Bestimmung des organisch gebundenen Phosphats (ATP) nach SUGINO & MIYOSHI (179)

Die belichtete Thylakoidsuspension wird mit 1 ml der folgenden Lösung versetzt: 3% Ammoniumheptamolybdat, 5,5% konzentrierte HCl, 1% Triäthylamin und 1% gesättigtes Bromwasser. Die einzelnen Komponenten sollten in der oben angegebenen Reihenfolge unter ständigem Rühren miteinander vermischt werden. Die Lösung ist maximal einen Tag haltbar.

Das beim Abstoppen der Reaktion ausgefallene Protein und der schwerlösliche Triäthylamin-Phosphomolybdat-Komplex werden 15-20 min in einer Hettich-Zentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit und Raumtemperatur abzentrifugiert. Vom klaren, evtl. leicht bläulich gefärbten Überstand werden je 0,5 ml zu 10 ml H_2O in Szintillationsgefäße pipettiert und die Radioaktivität in einem PACKARD Tri-Carb-Szintillationszähler bestimmt (^{32}P-Kanal, Diskriminatoren: 30 bis ∞). Als Standard wird ein kleines Volumen der ^{32}P-Stammlösung 1:100 verdünnt. Hiervon wird je 0,1 ml in 2 beliebige auszuzählende Proben pipettiert.

Die Photophosphorylierungs-Aktivität berechnet sich wie folgt:

$$\mu\text{Mol ATP/mg Chl·h} = \text{Faktor} \cdot \frac{\text{cpm}_{\text{Probe}}}{\text{cpm}_{\text{Probe+Standard}} - \text{cpm}_{\text{Probe}}}$$

$$\text{Faktor} = \frac{4 \cdot 100 \cdot 60 \cdot 2}{100} = 480$$

4 : Verdünnungsfaktor der Probe
100 : Umrechnung auf 1 mg Chl
60 : Umrechnung von min auf h
2 : 2 µMol Phosphat im Ansatz
100 : Verdünnungsfaktor des Standards

17. Bestimmung der ATPase-Aktivität von CF_1 nach FARRON & RACKER (57)

50 bis 200 µg CF_1 (in 100 µl) werden mit 10 µl 0,5 M ATP, 10 µl 67 mM DTT und 10 µl Lösung A (40 mM Tris-HCl, 4 mM EDTA, 4 mM ATP pH 7,8) bei 60°C 4 min inkubiert und dann in Eis abgekühlt. Die CF_1-Konzentration wird mit Lösung A auf 2,5 bis 5,0 µg CF_1/100 µl eingestellt und 100 µl dieser Lösung des aktivierten Enzyms zur ATPase-Bestimmung mit 0,5 ml Lösung B (100 mM Tris-HCl, 10 mM $CaCl_2$, 0,2 mg BSA/ml pH 9,0) und 0,4 ml 12,5 mM ATP 10 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird mit 1 ml 5% Trichloressigsäure gestoppt. Nach 5 min Zentrifugation (Tischzentrifuge) fügt man zur Bestimmung des gebildeten Phosphats im Eisbad 1 ml der folgenden Lösung hinzu: 1 g $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$/18 ml H_2O + 2 ml 16% Ammoniumheptamolybdat in 10 N H_2SO_4. Die Proben werden 30 s bei 37°C inkubiert und dann ins Eisbad zurückgestellt. Die entstehende Blaufärbung wird gegen einen Ansatz ohne CF_1 bei OD_{740} gemessen. Die ATPase-Aktivität errechnet sich wie folgt:

$$\mu\text{Mol } P_i\text{/mg Protein} \cdot \text{min} = \frac{1000}{\mu g \cdot CF_1} \cdot \frac{1}{10} \cdot \frac{OD740}{1,05} = \frac{95}{\mu g \cdot CF_1} \cdot OD_{740}$$

$1000/\mu g \cdot CF_1$: Umrechnung auf 1 mg Protein
$1/10$: Umrechnung auf 1 min
$OD_{740}/1,05$: Berechnung der umgesetzten µMole
(1 µMol $P_i \mathrel{\hat{=}} \Delta\, OD_{740} = 1,05$)

18. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach LUGTENBERG et al. (104)

Die Elektrophorese wurde in einer Slabgel-Apparatur durchgeführt (104). Die Abmessungen der verwendeten Trenngele betragen: Länge 8,5 cm, Breite 13 cm, Dicke ca. 1,5 mm. Nach Polymerisation wird das Trenngel mit 3 cm Sammelgel überschichtet, das 20 2 cm lange Taschen für die Proben enthält. Lösungen zur Herstellung des Gels:

1. 44% Acrylamid, 0,8% Methylenbisacrylamid in H_2O (Trenngel)
2. 750 mM Tris-HCl pH 8,8 (Trenngel)
3. 30% Acrylamid, 0,8% Methylenbisacrylamid in H_2O (Sammelgel)
4. 250 mM Tris-HCl pH 6,8 (Sammelgel)

5. 10% SDS
6. 10% Ammoniumperoxodisulfat
7. N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin

Wenn nicht anders angegeben werden Trenngele mit 12,5% Acrylamid verwendet. Ausreichend für 2 Gele werden 10,65 ml Lösung 1; 18,75 ml Lösung 2; 6,4 ml H_2O und 0,75 ml Lösung 5 vermischt und bei 4°C entgast. Nach Zusatz von 0,95 ml Lösung 6 und 75 µl 7 wird nochmals kurz entgast, das Gel in die Apparatur gefüllt und mit wenig Isopropanol überschichtet. Ist das Gel polymerisiert, so wird das Isopropanol entfernt und mit dem Sammelgel überschichtet, das man aus 1,25 ml Lösung 3; 6,25 ml Lösung 4; 4,6 ml H_2O; 0,13 ml Lösung 5; 0,3 ml Lösung 6 und 25 µl Lösung 7 in gleicher Weise wie das Trenngel mischt und entgast. Nach ca. 12 h Lagerung bei 4°C ist das Gel gebrauchsfertig.

Der Elektrodenpuffer besteht aus 3,025 g Tris, 14,45 g Glycin und 1 g SDS pro 1 l H_2O. Die Elektrophorese wird bei einer konstanten Stromstärke von 27 mA bei Raumtemp. durchgeführt (Dauer ca. 3-3,5 h).

80 µl der Analysenproben (mit ca. 100-200 µg Protein) werden mit 120 µl Proteinlösungsgemisch (= 20 µl 630 mM Tris-HCl pH 6,8; 10 µl 0,05% Bromphenolblau in 50% Glyzerin; 40 µl 50% Glyzerin; 40 µl 10% SDS und 10 µl Mercaptoäthanol) vermischt und entweder 5 min bei 97°C erhitzt oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Von den so vorbereiteten Proben werden bis zu 25 µl/Tasche in der Elektrophorese eingesetzt.

Die Färbelösung besteht aus 1,25 g Coomassie Brilliant Blue in 450 ml 50% Methanol + 50 ml Eisessig. Die Färbedauer beträgt 2-3 h. Entfärbt wird in 7,5% Eisessig, 5% Methanol.

19. Immunisierung von Kaninchen

Aus der Ohrvene werden zunächst ca. 15 ml Kontrollblut gezapft. Zur ersten subkutanen Injektion werden 1,5 ml Proteinlösung (maximal 1 mg Protein) mit 1,5 ml komplettem Freund'schem Adjuvans (DIFCO Laboratories, Detroit) vermischt und bis zum Entstehen einer homogenen Paste im Eisbad mit Ultraschall behandelt. Diese Paste wird unter die Rückenhaut und zwischen die Zehen der Hinterpfote subkutan gespritzt. 4 Wo-

chen später werden ca. 20 ml Blut abgenommen (hiermit werden erste Tests durchgeführt) und eine Booster-Injektion vorgenommen. Diese erfolgt mit ca. 1 mg Protein in 150 mM NaCl intravenös. Am 7., 9. und 11. Tag nach der Booster-Injektion wird Blut entnommen (jeweils ca. 30 ml). Gegebenenfalls wird das Kaninchen am 11. Tag geschlachtet und ausgeblutet (ca. 100 ml).

Zur Gewinnung des Serums wird das Blut über Nacht stehengelassen, wobei sich der Blutkuchen absetzt. Das Serum wird zunächst 20 min in einer HETTICH-Zentrifuge bei 3500 rpm zentrifugiert und dann durch einen SARTORIUS-Filter (SM 11306, Porengröße 0,45) gepreßt. Das klare Serum wird bei -20°C gelagert.

20. Qualitative und quantitative immunologische Analysen

20.1. Zweidimensionale Immunodiffusion nach OUCHTERLONY (135)

Drei hintereinanderliegende Objektträger (76x26 mm) werden auf einem Rahmen der Fa. CAMAG zunächst mit 1 ml 0,8% Agarose am Rand abgedichtet und dann mit 10 ml 0,8% Agarose überschichtet. Die Agarose wird in Barbitalpuffer, pH 8,6, μ=0,02, (14) durch Erwärmung gelöst. Nach Erhärten werden zur Aufnahme der Antigene und Antiseren Löcher in bestimmter Anordnung in das Gel gestanzt (z.B. Abb.25-27). In der Regel werden 6-8 μl Antigen bzw. Antiserum in die Löcher pipettiert. Die Diffusion erfolgt für ca. 24 h bei Raumtemp. in einer feuchten Kammer. Danach werden die Gele samt Halterung je 2 x für 12 h in 2% NaCl gewaschen; bei Anwesenheit chlorophyllhaltiger Antigene wird der Waschlösung ca. 0,1% Triton zugesetzt. Abschließend wird noch einmal 12 h in Wasser gewaschen, danach die Gelschicht auf den Objektträgern getrocknet und die Proteinpräzipitate in 0,1% Amidoschwarz, 45% Methanol, 10% Eisessig für 10 min gefärbt. Entfärbt wird 3 x 10 min in 45% Methanol, 10% Eisessig.

20.2. Einfache, eindimensionale Elektroimmunodiffusion (EID) nach LAURELL (94)

10 ml durch Erwärmung verflüssigtes, 0,8%iges Agarose-Gel (Puffer wie in 20.1.) läßt man auf 58°C abkühlen, mischt dann schnell mit Antiserum und beschichtet wie unter 20.1. beschrie-

ben 3 Objektträger. Nach Abkühlen und Erhärten des Gels werden in der Regel 3 Löcher in die Agarose gestanzt (Abb. 2), die zur Aufnahme von exakt 6µl Antigen dienen. Die Elektrophorese erfolgt für 18h bei 3,5 bzw. 5,3 V/cm und 15°C. Der Elektrodenpuffer besitzt die gleiche Zusammensetzung wie der Gelpuffer (siehe 20.1.). Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Objektträger wie unter 20.1. weiterbehandelt und danach die Rocketlängen ausgemessen. Eine vorläufige Bestimmung kann auch schon direkt nach der Elektrophorese bei Betrachtung im Dunkelfeld vorgenommen werden.

20.3. Charge-shift-Elektrophorese nach HELENIUS & SIMONS (73)

Die Methode dient der Unterscheidung hydrophiler von amphiphilen Proteinen. Durch Bindung geladener Detergenzien an amphiphile Proteine wird deren Ladung und somit deren Wanderungsgeschwindigkeit bzw. -richtung in der Elektrophorese verändert. Hydrophile Proteine sollen in ihrer Mobilität unbeeinflußt bleiben.

Insgesamt müssen 3 voneinander unabhängige Elektrophoresen durchgeführt werden, da für jede ein spezieller Elektroden- und Gelpuffer sowie besonders vorbereitete Proben notwendig sind. Hierzu werden (wie schon in 20.1. beschrieben) Objektträger auf drei verschiedenen Rahmen mit 0,8%igem Agarosegel beschichtet, das 60 mM Barbital-Natrium pH 8,7 +

a. 0,5% Triton X 100

b. 0,5% Triton X 100, 0,25% Na-desoxycholat bzw.

c. 0,5% Triton X 100, 0,05% Cetyltrimethylammoniumbromid

enthält. Nach Erhärten werden nach dem folgenden Schema Löcher und Gräben in die Gele gestanzt:

Die Löcher dienen zur Aufnahme der Analysenproben (2µl), die ca. 0,7 - 1,5 mg Protein/ml und die oben angegebenen Detergenzien in jeweils der vierfachen Konzentration enthalten. Nach Applikation der Proben auf die Gelplatten mit den entsprechenden Detergenzien wird eine 30minütige Elektrophorese bei 15V/cm durchgeführt. Der Elektrodenpuffer besitzt dieselbe Zusammensetzung wie der entsprechende Gelpuffer (das

Triton kann auch fehlen). Nach Beendigung der Elektrophorese wird auch der vorgestanzte Graben ausgehoben und mit ca. 40 µl Antiserum gefüllt, worauf eine ca. 24stündige Diffusion bei RT folgt (siehe 20.1.). Waschen, Trocknen und Färben der Gelplatten wie unter 20.1. (siehe auch Abb. 7).

21. Aufnahme von Fluoreszenz-Emissions-Spektren

Die Spektren wurden mit einem Spektralphotometer PMQ II mit Fluoreszenzansatz ZFM 4 der Fa. ZEISS aufgenommen. Anregungswellenlänge: 280 nm.

22. Konzentrierung von Proteinfraktionen

Proteinlösungen wurden durch Druckfiltration (ca. 2 atü) je nach Molekulargewicht der betreffenden Proteine über AMICON YM 5-Filter (Abscheidegrad: 5000d) oder AMICON XM 100-Filter (Abscheidegrad: 100000d) konzentriert.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. ABRAMS, A. & BARON, C. (1968): Reversible attachment of adenosine triphosphatase to streptococcal membranes and the effect of magnesium ions. - Biochemistry 7: 501 - 507.

2. ABRAMS, A. & SMITH, J.B. (1974): Bacterial membrane ATPase. - In: The enzymes, Vol. 10 pp 395 - 429 (BOYER, P.D. ed.). - Academic Press, New York, London.

3. ABRAMS, A., MORRIS, D. & JENSEN, C. (1976): Chymotryptic conversion of bacterial membrane ATPase to an active form with modified α chains and defective membrane binding properties. - Biochemistry 15: 5560 - 5566.

4. AKERLUND, H.-E., ANDERSSON, B., PERSSON, A. & ALBERTSSON, P.-Å. (1979): Isoelectric points of spinach thylakoid membrane surfaces as determined by cross partition. - Biochim. Biophys. Acta 552: 238 - 246.

5. AMZEL, L.M. & PEDERSEN, P.L. (1978): Adenosine triphosphatase from rat liver mitochondria. - J. Biol. Chem. 253: 2067 - 2069.

6. ARNON, D.J. (1949): Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. - Plant Physiol. 24: 1 - 5.

7. ARNTZEN, C.J., ARMOND, P.A., ZETTINGER, C.S., VERNOTTE, C. & BRIANTAIS, J.M. (1974): Lactoperoxidase-catalyzed iodination of chloroplast membranes. I. Analysis of surface-localized proteins. - Biochim. Biophys. Acta 347: 329 - 339.

8. AVRON, M. (1960): Photophosphorylation by swiss-chard chloroplasts. - Biochim. Biophys. Acta 40: 257 - 272.

9. AVRON, M. (1963): A coupling factor in photophosphorylation. - Biochim. Biophys. Acta 77: 699 - 702.

10. BAIRD, B.A. & HAMMES, G.G. (1976): Chemical cross-linking studies of chloroplast coupling factor 1. - J. Biol. Chem. 251: 6953 - 6962.

11. BAIRD, B.A. & HAMMES, G.G. (1977): Chemical cross-linking studies of beef heart mitochondrial coupling factor 1. - J. Biol. Chem. 252: 4743 - 4748.

12. BAIRD, B.A. & HAMMES, G.G. (1979): Structure of oxidative- and photophosphorylation coupling factor complexes. - Biochim. Biophys. Acta 549: 31 - 53.

13. BARBER, J. (1980): Membrane surface charges and potentials in relation to photosynthesis. - Biochim. Biophys. Acta 594: 253 - 308.

14. BECKER, W. & SIEBER. A. (1975): Methoden der qualitativen und quantitativen Immunelektrophorese. - Behring Institut, Frankfurt a. M.

15. BÉLIVEAU, R., MORONEY, J.V. & McCARTY, R.E. (1982): Endogenous fluorescence of coupling factor 1 from spinach chloroplasts. - Arch. Biochem. Biophys. 214: 668 - 674.

16. BENNUN, A. & RACKER, E. (1969): Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. IV. Interaction of coupling factor 1 from chloroplasts with components of the chloroplast membrane. - J. Biol. Chem. 244: 1325 - 1331.

17. BERZBORN, R., MENKE, W., TREBST, A. & PISTORIUS, E. (1966): Über die Hemmung photosynthetischer Reaktionen isolierter Chloroplasten durch Chloroplasten-Antikörper. - Z. Naturf. 21b: 1057 - 1059.

18. BERZBORN, R. (1967): Untersuchungen über die molekulare Oberflächenstruktur der Chloroplasten-Thylakoide mit Hilfe von Antikörpern. - Inaugural-Dissertation, Universität Köln.

19. BERZBORN, R.J. (1969): Untersuchungen über die Oberflächenstruktur des Thylakoidsystems der Chloroplasten mit Hilfe von Antkörpern gegen die Ferredoxin-NADP-Reduktase. - Z. Naturf. 24b: 436 - 446.

20. BERZBORN, R.J. (1972): Trennung von Untereinheiten des Kopplungsfaktors 1 der Chloroplasten (CF_1) und deren immunologische Charakterisierung. - Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 353: 693.

21. BERZBORN, R.J., KOPP, F. & MÜHLETHALER, K. (1974): Coupling factor 1 (CF_1), a mobile peripheral protein in the thylakoid surface of spinach chloroplasts. - In: Proc. third int. Congr. Photosynthesis, pp 809 - 820 (AVRON, M. ed.). - Elsevier, Amsterdam.

22. BERZBORN, R.J., KOPP, F. & MÜHLETHALER, K. (1974): Mobility of chloroplast coupling factor 1 (CF_1) at the thylakoid surface as revealed by freeze-etching after antibody labelling. - Z. Naturf. 29c: 694 - 699.

23. BERZBORN, R.J., JOHANNSSON, B.C. & BALTSCHEFFSKY, M. (1975): Immunological and fluorescence studies with the coupling factor ATPase from Rhodospirillum rubrum. - Biochim. Biophys. Acta 396: 360 - 370.

24. BERZBORN, R.J. & SCHRÖER, P. (1976): Photophosphorylation: Mechanism of reconstitution by coupling factor 1((CF_1). - FEBS Lett. 70: 271 - 275.

25. BERZBORN, R.J. & LOCKAU, W. (1977): Antibodies. - In: Encyclopedia of Plant Physiology, New series Vol. 5 pp 283 - 296 (TREBST, A. & AVRON, M. eds.). - Berlin, Heidelberg.

26. BERZBORN, R.J. & ROOS, P. (1979): Binding forces between CF_1 and CF_0 within the chloroplast ATP-synthetase not only ionic. - XIth int. Congr. Biochemistry, Toronto, Abstract-Book p. 448 (Nr. 06-6-R70).

27. BERZBORN, R.J. & ROOS, P. (1980): Immunological determination of photosynthetic ATP synthase CF_1. - Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 361: 1476 - 1477.

28. BERZBORN, R.J., MÜLLER, D., ROOS, P. & ANDERSSON, B. (1981): Significance of different quantitative determinations of photosynthetic ATP-synthase CF_1 for heterogeneous

CF_1 distribution and grana formation. - In: Proc. 5th int. Congr. Photosynthesis, Vol. III: Structure and molecular organization of the photosynthetic membrane, pp 107 - 120 (AKOYUNOGLOU, G. ed.). - Philadelphia.

29. BINDER, A., JAGENDORF, A. & NGO, E. (1978): Isolation and composition of the subunits of spinach chloroplast coupling factor protein. - J. Biol. Chem. 253: 3094 - 3100.

30. BINDER, A., BOHLER, M.C., WOLF, M. & BACHOFEN, R. (1981): The proton ATPase of the thermophilic cyanobacterium Mastigocladus laminosus. - In: Proc. 5th int. Congr. Photosynthesis, Vol. II: Electron transport and Photophosphorylation, pp 771 - 778 (AKOYUNOGLOU, G. ed.). - Philadelphia.

31. BÖHME, H. (1978): Quantitative determination of ferredoxin, ferredoxin-$NADP^+$-reductase and plastocyanin in spinach chloroplasts. - Eur. J. Biochem. 83: 137 - 141.

32. BONNEKAMP, G. (1977): Untersuchungen zur Isolierung und Funktion der δ-Untereinheit der photosynthetischen ATP-Synthetase. - Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum.

33. BOUTHYETTE, P.-Y. & JAGENDORF, A.T. (1978): The site of synthesis of pea chloroplast coupling factor 1 . - Plant Cell Physiol. 19: 1169 - 1174.

34. BRAGG, P.D. & HOU, C. (1975): Subunit composition, function, and spatial arrangement in the Ca^{2+}- and Mg^{2+}- activated adenosine triphosphatases of Escherichia coli and Salmonella typhimurium. - Arch. Biochem. Biophys. 167: 311 - 321.

35. BRAGG, P.D. & HOU, C. (1976): Cross-linking of minor subunits in Ca^{2+}, Mg^{2+}-activated ATPase of Escherichia coli. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 72: 1042 - 1048.

36. BRAGG, P.D. & HOU, C. (1978): Binding of the Ca^{2+}, Mg^{2+}-activated adenosine triphosphatase of Escherichia coli to phospholipid vesicles. - Can. J. Biochem. 56: 559 - 564.

37. BRAGG, P.D. & HOU, C. (1979): Proteolysis of the delta subunit is required for release of the Ca^{2+}, Mg^{2+}-activated ATPase from the cell membrane of Escherichia coli. - FEBS Lett. 103: 12 - 16.

38. BROWN, R.E. & CUNNINGHAM, C.C. (1982): Negatively charged phospholipid requirement of the oligomycin-sensitive mitochondrial ATPase. - Biochim. Biophys. Acta 684: 141 - 145.

39. CATTERALL, W.A., COTTY, W.A. & PEDERSEN, P.L. (1973): Adenosine triphosphatase from rat liver mitochondria. - J. Biol. Chem. 248: 7427 - 7431.

40. CINTRON, N.M. & PEDERSEN, P.L. (1979): A protein inhibitor of the mitochondrial adenosine triphosphatase complex of rat liver. - J. Biol. Chem. 254: 3439 - 3443.

41. CLARKE, H.G.M. & FREEMAN, T. (1968): Quantitative immunoelectrophoresis of human serum proteins. - Clin. Sci. 35: 403 - 413.

42. COCUCCI, M. & BELLARIN-DENTI, A. (1981): Effect of polar lipids on ATPase activity of membrane preparations from germinating radish seeds. - Plant Physiol. 68: 377 - 381.

43. COX, G.B., DOWNIE, J.A., LANGMAN, L., SENIOR, A.E., ASH, G., FAYLE, D.R.H. & GIBSON, F. (1981): Assembly of the adenosine triphosphatase complex in Escherichia coli: Assembly of F_0 is dependent on the formation of specific F_1 subunits. - J. Bacteriol. 148: 30 - 42.

44. COX, R.P. & ANDERSSON, B. (1981): Lateral and transverse organization of cytochromes in the chloroplast thylakoid membrane. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 103: 1336 - 1342.

45. CRIDDLE, R.S., PACKER, L. & SHIEH, P. (1977): Oligomycin-dependent ionophoric protein subunit of mitochondrial adenosinetriphosphatase. - Proc. natn. Acad. Sci. USA 74: 4306 - 4310.

46. CROWLE, A.J. (1973): Immunodiffusion. - New York, London.

47. DARSZON, A. & GOMEZ-PUYOU, A. (1982): Extraction of mitochondrial protein-lipid complexes into organic solvents: An approach to study the interaction between the ATPase and the mitochondrial ATPase-inhibitor protein. - Eur. J. Biochem. 121: 427 - 433.

48. DETERS, D.W., RACKER, E., NELSON, N. & NELSON, H. (1975): Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. XV. Approaches to the active site of coupling factor I. - J. Biol. Chem. 250: 1041 - 1047.

49. DIANOUX, A.-C., VIGNAIS, P.V. & TSUGITA, A. (1981): Partial proteolysis of the natural ATPase inhibitor from beef heart mitochondria. - FEBS Lett. 130: 119 - 123.

50. DICKERSON, R.E. (1971): The structure of cytochrome c and the rates of molecular evolution. - J. Mol. Evol. 1: 26 - 45.

51. DIJKMANS, H. & DANIEL, A.-M. (1981): Binding of the chloroplast coupling factor CF_1 to lipid vesicles. - Can. J. Biochem. 59: 16 - 21.

52. DOWNIE, J.A., GIBSON, F. & COX, G.B. (1979): Membrane adenosine triphosphatases of prokaryotic cells. - Annu. Rev. Biochem. 48: 103 - 131.

53. DUNN, S.D. & FUTAI, M. (1980): Reconstitution of a functional coupling factor from the isolated subunits of Escherichia coli F_1 ATPase. - J. Biol. Chem. 255: 113 - 118.

54. DUNN, S.D., HEPPEL, L.A. & FULLMER, C.S. (1980): The NH_2-terminal portion of the α subunit of Escherichia coli F_1 ATPase is required for binding the δ subunit. - J. Biol. Chem. 255: 6891 - 6896-

55. DUNN, S.D. & HEPPEL, L.A. (1981): Properties and functions of the subunits of the Escherichia coli coupling factor ATPase. - Arch. Biochem. Biophys. 210: 421 - 436.

56. FARRON, F. (1970): Isolation and properties of a chloroplast coupling factor and heat-activated adenosine triphosphatase. - Biochemistry 9: 3823 - 3828.

57. FARRON, F. & RACKER, E. (1970): Studies on the mechanism of the conversion of coupling factor 1 from chloroplasts to an active adenosine triphosphatase. - Biochemistry 9: 3829 - 3836.

58. FESSENDEN-RADEN, J.M. (1971): Reconstitution of highly resolved particles with succinate dehydrogenase and coupling factors. - In: Probes of structure and function of macromolecules and membranes, Vol. 1, pp 445 - 448 (CHANCE, B., LEE, C.P. & BLASIE, J.K. eds.). - Academic Press, New York.

59. FILLINGAME, R.H. (1980): The proton-translocating pumps of oxidative phosphorylation. - Annu. Rev. Biochem. 49: 1079 - 1113.

60. FRASCH, W.D., DELUCA, C.R., KULZICK, M.J. & SELMAN, B.R. (1980): A quantitative estimation of chloroplast thylakoid-bound coupling factor 1 by rocket immunoelectrophoresis. - FEBS Lett. 122: 125 - 128.

61. FUTAI, M., STERNWEIS, P.C. & HEPPEL, L.A. (1974): Purification and properties of reconstitutively active and inactive adenosinetriphosphatase from Escherichia coli. - Proc. natn. Acad. Sci. USA 71: 2725 - 2729.

62. FUTAI, M. & KANAZAWA, H. (1980): Role of subunits in proton-translocating ATPase (F_0-F_1). - Current topics in bioenergetics 10: 181 - 215.

63. FUTAI, M., KANAZAWA, H., TAKEDA, K. & KAGAWA, Y. (1980): Reconstitution of ATPase from the isolated subunits of coupling factor F_1's of Escherichia coli and thermophilic bacterium PS 3. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 96: 227 - 234.

64. GARBER, M.P. & STEPONKUS, P.L. (1974): Identification of chloroplast coupling factor by freeze-etching and negative-staining techniques. - J. Cell Biol. 63: 24 - 34.

65. GIAQUINTA, R.T., SELMAN. B.R., BERING, C.L. & DILLEY, R.A. (1974): Inhibition of coupling factor activity of chloroplast membranes by diazonium compounds. - J. Biol. Chem. 249: 2873 - 2878.

66. GIRAULT, G., GALMICHE, J.M. & VERMEGLIO, A. (1974): CF_1 reconstitution of EDTA treated membrane fragments observed by means of photophosphorylation and 515 nm absorbance changes. - Proc. third int. Congr. Photosynthesis, pp 839 - 847 (AVRON, M. ed.). - Elsevier, Amsterdam.

67. HAEHNEL, W., BERZBORN, R.J. & ANDERSSON, B. (1981): Localization of the reaction side of plastocyanin from

immunological and kinetic studies with inside-out thylakoid vesicles. - Biochim. Biophys. Acta. 637: 389 - 399.

68. HANSON, R.L. & KENNEDY, E.P. (1973): Energy-transducing adenosine triphosphatase from Escherichia coli: Purification, properties and inhibition by antibody. - J. Bacteriol. 114: 772 - 781.

69. HARRIS, D.A. & SLATER, E.C. (1975): Tightly bound nucleotides of the energy-transducing ATPase of chloroplasts and their role in photophosphorylation. - Biochim. Biophys. Acta 387: 335 - 348.

70. HARRIS, D.A. (1981): The coupling ATPase complex: An evolutionary view. - Bio Systems 14: 113 - 121.

71. HEISE, K.P. & JACOBI, G. (1973): The correlation of lipid release and photochemical activities in isolated spinach chloroplasts. - Z. Naturf. 28c: 120 - 127.

72. HELENIUS, A. & SIMONS, K. (1975): Solubilization of membranes by detergents. - Biochim. Biophys. Acta 415: 29 - 79.

73. HELENIUS, A. & SIMONS, K. (1977): Charge shift electrophoresis: Simple method for distinguishing between amphiphilic and hydrophilic proteins in detergent solution. - Proc. natn. Acad. Sci. USA 74: 529 - 532.

74. HESSE, H., JANK-LADWIG, R. & STROTMANN, H. (1976): On the reconstitution of photophosphorylation in CF_1-extracted chloroplasts. - Z. Naturf. 31c: 445 - 451.

75. HORSTMANN, L.L. & RACKER, E. (1970): Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. XXII. Interaction between mitochondrial adenosine triphosphatase inhibitor and mitochondrial adenosine triphosphatase. - J. Biol. Chem. 245: 1336 - 1344.

76. HOWELL, S.H. & MOUDRIANAKIS, E.N. (1967): Function of the quantasome in photosynthesis: Structure and properties of membrane-bound particle active in the dark reactions of photophosphorylation. - Proc. natn. Acad. Sci. USA 58: 1261 - 1268.

77. JAGENDORF, A.T. & SMITH, M. (1962): Uncoupling phosphorylation in spinach chloroplasts by absence of cations. - Plant Physiol. 37: 135 - 141.

78. JAGENDORF, A.T. (1975): Mechanism of photophosphorylation. - In: Bioenergetics of photosynthesis, pp 413 - 492, (GOVINDJEE ed.). - Academic Press, New York.

79. JAGENDORF, A.T. (1977): Photophosphorylation. - In: Encyclopedia of Plant Physiology, New series Vol. 5, pp 307 - 337 (TREBST,A. & AVRON, M. eds.). - Berlin, Heidelberg, New York.

80. JENNINGS, R.C., GARLASCHI, F.M., GEROLA, P.D. & FORTI, G. (1979): Partition zone penetration by chymotrypsin and the localization of the chloroplast flavoprotein and photosystem II. - Biochim. Biophys. Acta 546: 207 - 219.

81. JOST, P.C., GRIFFITH, O.H., CAPALDI, R.A. & VANDERKOOI, G. (1973): Evidence for boundary lipids in membranes. Proc. natn. Acad. Sci. USA 70: 480 - 484.

82. KAGAWA, Y., SONE, N., YOSHIDA, M.,HIRATA, H. & OKAMOTO, H. (1976): Proton translocating ATPase of thermophilic bacterium. Morphology, subunits, and chemical composition. - J. Biochem. 80: 141 - 151.

83. KAGAWA, Y. (1978): Protonophoric action of coupling factor ATPase - Its reconstitution from purified subunits, reconstitution into ATP-synthesizing vesicles, and image reconstruction. - In: Energy conservation in biological membranes, pp 195 - 219 (SCHÄFER, G. & KLINGENBERG, M. eds.). - Berlin, Heidelberg, New York.

84. KAHN, J.S. (1968): Chlorotri-n-butyltin an inhibitor of photophosphorylation in isolated chloroplasts. - Biochim. Biophys. Acta 153: 203 - 210.

85. KANNANGARA, C.G., VAN WIK, D. & MENKE, W. (1970): Immunological evidence for the presence of latent Ca^{2+} dependent ATPase and carboxydismutase on the thylakoid surface. - Z. Naturf. 25b: 613 - 618.

86. KNOWLES, A.F., GUILLORY, R.J. & RACKER, E. (1971): Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. XXIV. A factor required for the binding of mitochondrial adenosine triphosphatase to the inner mitochondrial membrane. - J. Biol. Chem. 246: 2672 - 2679.

87. KNOWLES, A.F. & PENEFSKY, H.S. (1972): The subunit structure of beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. Physical and chemical properties of isolated subunits. - J. Biol. Chem. 247: 6624 - 6630.

88. KOZLOV, I.A. & MIKELSAAR, H.N. (1974): On the subunit structure of soluble mitochondrial ATPase. - FEBS Lett. 43: 212 - 214.

89. KOZLOV, I.A., KONDRASHIN, A.A., KONONENKO, V.A. & METELSKY, S.T. (1976): Functional role of soluble mitochondrial ATPase subunits. - Bioenergetics 8: 1 - 7.

90. LAEMMLI, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. - Nature 227: 680 - 685.

91. LAM, K.W., WARSHAW, J.B. & SANADI, D.R. (1967): The mechanism of oxidative phosphorylation. XIV. Purification and properties of a second energy-transfer factor. - Arch. Biochem. Biophys. 119: 477 - 484.

92. LARRAGA, Y., MOLLINEDO, F., RUBIO, N. & MUÑOZ, E. (1981): Influence of the α-, β- and γ-subunits of the energy-transducing adenosine triphosphatase from Micrococcus lysodeikticus in the immunochemical properties of the protein and in their reconstitution studied by a radioimmunoassay method. - Biochem. J. 193: 729 - 735.

93. LARSON, R.J. & SMITH, J.B. (1977): Assembly of the catalytic unit of the Escherichia coli membrane ATPase in vitro requires the γ-chain. - Biochemistry 16: 4266 - 4270.

94. LAURELL, C.-B. (1966): Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. - Anal. Biochem. 15: 45 - 52.

95. LEIMGRUBER, R.M., JENSEN, C. & ABRAMS, A. (1978): Accessibility of the α-chains in membrane-bound and solubilized bacterial ATPase to chymotryptic cleavage. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 81: 439 - 447.

96. LENAZ, G. (1972): Studies on the organization of proteins and lipids in the inner mitochondrial membrane. - Ann. N.Y. Acad. Sci. 195: 39 - 49.

97. LIEN, S. & RACKER, E. (1971): Preparation and assay of chloroplast coupling factor CF_1. - In: Methods in enzymology, Vol. XXIII, pp 547 - 555 (SAN PIETRO ed.). - Academic Press, New York.

98. LIEN, S. & RACKER, E. (1971): Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. VIII. Properties of silicotungstate-treated subchloroplast-particles. - J. Biol. Chem. 246: 4298 - 4307.

99. LIEN, S., BERZBORN, R.J. & RACKER, E. (1972): Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. IX. Studies on the subunit structure of coupling factor 1 from chloroplasts. - J. Biol. Chem. 247: 3520 - 3524.

100. LINNANE, A.W. & TITCHENER, E.B. (1960): Studies on the mechanism of oxidative phosphorylation. VI. A factor for coupled oxidation in the electron transport particle. - Biochim. Biophys. Acta 39: 469 - 478.

101. LIVNE, A. & RACKER, E. (1968): A new coupling factor for photophosphorylation. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 32: 1045 - 1049.

102. LIVNE, A. & RACKER, E. (1969): Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. VI. Interaction of coupling factor 1 from chloroplasts with a new coupling factor for photophosphorylation. - J. Biol. Chem. 244: 1339 - 1344.

103. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. - J. Biol. Chem. 193: 265 - 275.

104. LUGTENBERG, B., MEIJERS, J., PETERS, R., VAN DER HOEK, P. & VAN ALPHEN, L. (1975): Electrophoretic resolution of the 'major outer membrane protein' of Escherichia coli K12 into four bands. - FEBS Lett. 58: 254 - 258.

105. MABUCHI, K., KANAZAWA, H., KAYANO, T. & FUTAI, M. (1981): Nucleotide sequence of the gene coding for the δ subunit of proton-translocating ATPase of Escherichia coli. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 102: 172 - 179.

106. MACCECCHINI, M.-L., RUDIN, Y., BLOBEL, G. & SCHATZ, G. (1979): Import of proteins into mitochondria: Precursor forms of the extramitochondrially made F_1-ATPase subunits of yeast. - Proc. natn. Acad. Sci. USA 76: 343 - 347.

107. MacLENNON, D.H. & TZAGOLOFF, A. (1968): Studies on the mitochondrial adenosine triphosphatase system. IV. Purification and characterization of the oligomycin sensitivity conferring protein. - Biochemistry 7: 1603 - 1610.

108. MARGULIS, L. (1970): Origin of eukaryotic cells. - Yale University Press, New Haven.

109. MARTELL, A.E. & CALVIN, M. (1958): Die Chemie der Metallchelat-Verbindungen. - Weinheim Bergstr.

110. McCARTY, R.E. & RACKER, E. (1966): Effect of a coupling factor and its antiserum on photophosphorylation and hydrogen ion transport. - Brookhaven Symp. Biol. 19: 202 - 214.

111. McCARTY, R. & RACKER, E. (1967): Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. II. The inhibition and stimulation of photophosphorylation by N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide. - J. Biol. Chem. 242: 3435 - 3439.

112. McCARTY, R.E. & RACKER, E. (1968): Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. III. Activation of adenosine triphosphatase and ^{32}P-labelled orthophosphate-adenosine triphosphate exchange in chloroplasts. - J. Biol. Chem. 243: 129 - 137.

113. McCARTY, R.E. (1978): The ATPase complex of chloroplasts and chromatophores. - In: Current topics of bioenergetics, Vol. 7, pp 245 - 278 (SANADI, D,R. & VERNON, L.P. eds.). - Academic Press, New York.

114. McEVOY, F.A. & LYNN, W.S. (1973): The peptides of chloroplast membranes. - Arch. Biochem. Biophys. 156: 335-341.

115. McKINNEY, D.W., BUCHANAN, B.B. & WOLOSIUK, R.A. (1979): Association of a thioredoxin-like protein with chloroplast coupling factor (CF_1). - Biochem. Biophys. Res. Commun. 86: 1178 - 1184.

116. MILLER, K.R. & STAEHELIN, L.A. (1976): Analysis of the thylakoid outer surface. Coupling factor is limited to unstacked membrane regions. - J. Cell Biol. 68: 30 - 47.

117. MILLER, K.R., MILLER, G.J. & McINTYRE, K.R. (1977): Organization of the photosynthetic membrane in maize mesophyll and bundle sheath chloroplasts. - Biochim. Biophys. Acta 459: 145 - 156.

118. MITCHELL, P. (1961): Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. - Nature 191: 144 - 148.

119. MITCHELL, P. (1974): A chemiosmotic molecular mechanism for proton-translocating adenosine triphosphatases. - FEBS Lett. 43: 189 - 194.

120. MÜLLER, D. (1974/75): Zur Methodik und Bedeutung einer quantitativen Bestimmung der membrangebundenen pho-

tosynthetischen ATP-Synthetase (CF_1). - Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum.

121. MÜLLER, H.W., SCHMITT, M., SCHNEIDER, E. & DOSE, K. (1979): Immunological and reconstitution studies on the adenosine triphosphatase complex from Rhodospirillum rubrum. - Biochim. Biophys. Acta 545: 77 - 85.

122. MURAKAMI, S. (1968): On the nature of the particles attached to the thylakoid membrane of spinach chloroplasts. - In: Comparative Biochemistry and Biophysics of Photosynthesis, pp 82 - 88 (SHIBATA, K., TAKAMIYA, A., JAGENDORF, A.T. & FULLER, R. C. eds.). - University of Tokyo Press, Tokyo.

123. NAKATANI, H.Y., BARBER, J. & MINSKI, M.J. (1979): The influence of the thylakoid membrane properties on the distribution of ions in chloroplasts. - Biochim. Biophys. Acta 545: 24 - 35.

124. NELSON, N., NELSON, H. & RACKER, E. (1972): Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. XII. Purification and properties of an inhibitor isolated from chloroplast coupling factor 1. - J. Biol. Chem. 247: 7657 - 7662.

125. NELSON, N., DETERS, D.W., NELSON, H. & RACKER, E. (1973): Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. XIII. Properties of isolated subunits of coupling factor 1 from spinach chloroplasts. - J. Biol. Chem. 248: 2049 - 2055.

126. NELSON, N., KARNER, B.I. & GUTNICK, D.L. (1974): Purification and properties of Mg^{2+}-Ca^{2+} adenosinetriphosphatase from Escherichia coli. - Proc. natn. Acad. Sci. USA 71: 2720 - 2724.

127. NELSON, N., KAMIENIETZKY, A., DETERS, D.W. & NELSON, H. (1975): Subunit structure and function of CF_1. - In: Electron transfer chains and oxidative phosphorylation, pp 149 - 154 (QUAGLIARIELLO, E. et al. eds.). - Amsterdam.

128. NELSON, N. (1976): Structure and function of chloroplast ATPase. - Biochim. Biophys. Acta 456: 314 - 338.

129. NELSON, N. & KARNY, O. (1976): The role of δ subunit in the coupling activity of chloroplast coupling factor 1. - FEBS Lett. 70: 249 - 253.

130. NELSON, N. (1977): Chloroplast coupling factor. - In: Encyclopedia of Plant Physiology, New series Vol. 5, pp 393 - 404 (TREBST, A. & AVRON, M. eds.). - Berlin, Heidelberg.

131. NELSON, N., NELSON, H. & SCHATZ, G. (1980): Biosynthesis and assembly of the proton-translocating adenosine triphosphatase complex from chloroplasts. - Proc. natn. Acad. Sci. USA 77: 1361 - 1364.

132. NELSON, N. (1981): Proton-ATPase of chloroplasts. - In: Current topics in bioenergetics, Vol. 11, pp 1 - 33 (SANADI, D.R. & VERNON, L.P. eds.). - Academic Press, New York.

133. NIEUWENHUIS, F.J.R.M. & BAKKENIST, A.R.J. (1977): Isolation and characterization of an inhibitory subunit of the Mg^{2+}-Ca^{2+}-ATPase of Escherichia coli. - Biochim. Biophys. Acta 459: 596 - 604.

134. OLESZKO, S. & MOUDRIANAKIS, E.N. (1974): The visualization of the photosynthetic coupling factor in embedded spinach chloroplasts. - J. Cell Biol. 63: 936 - 948.

135. OUCHTERLONY, Ö. (1962): Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. - Progr. Allergy 6: 30 - 154.

136. PARK, R.B. & SANE, P.V. (1971): Distribution of function and structure in chloroplast lamellae. - Annu. Rev. Plant Physiol. 22: 395 - 430.

137. PEDERSEN, P.L. (1975): Mitochondrial adenosine triphosphatase. - J. Bioenerg. 6: 243 - 275.

138. PENEFSKY, H.S. & WARNER, R.C. (1965): Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. VI. Studies on the mechanism of cold inactivation of mitochondrial adenosine triphosphatase. - J. Biol. Chem. 240: 4694 - 4702.

139. PENEFSKY, H.S. (1974): Mitochondrial and chloroplast ATPases. - In: The enzymes, Vol. 10, pp 375 - 395 (BOYER, P.D. ed.). - Academic Press, New York, London.

140. PICK, U. & RACKER, E. (1979): Purification and reconstitution of the N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-sensitive ATPase complex from spinach chloroplasts. - J. Biol. Chem. 254: 2793 - 2799.

141. PITOTTI, A., DABBENI-SALA, F. & BRUNI, A. (1980): Phospholipid-dependent assembly of mitochondrial ATPase complex. - Biochim. Biophys. Acta 600: 79 - 90.

142. PULLMANN, M.E. & MONROY, G.C. (1963): A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase. - J. Biol. Chem. 238: 3762 - 3769.

143. RACKER, E. (1976): A new look at mechanisms in bioenergetics. - Academic Press, New York.

144. RITZ-GOLD, C.J., GOLD, C.M. & BRODIE, A.F. (1979): Tryptic proteolysis of coupling factor-latent ATPase from Mycobacterium phlei. Theoretical modeling of structure-function relationships.- Biochim. Biophys. Acta 547: 1 - 17.

145. ROBBINS, B.A., WONG, S.-Y., HATEFI, Y. & GALANTE, Y.M. (1981): Studies on the immunological properties of complex V (mitochondrial ATP synthetase complex). - Arch. Biochem. Biophys. 210: 489 - 497.

146. ROOS, P. (1978): Untersuchungen zur Spezifität der Bindung der peripheren ATPase (CF_1) in der photosynthetischen ATP-Synthetase. - Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum.

147. ROOS, P. & BERZBORN, R.J. (1980): Immunochemische Bestimmung der photosynthetischen ATP-Synthetase CF_1.

- Botanikertagung in Bochum, Kurzfassungen der Vorträge und Poster, p. 131. - Bochum.

148. SALTON, M.R.J. & SCHOR, M.T. (1972): Subunit structure and properties of two forms of adenosine triphosphatase released from Micrococcus lysodeikticus membranes. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 49: 350 - 357.

149. SANDERMANN, H. (1978): Regulation of membrane enzymes by lipids. - Biochim. Biophys. Acta 515: 209 - 237.

150. SANE, P.V. (1977): The topography of the thylakoid membrane of the chloroplast. - In: Encyclopedia of Plant Physiology, New series, Vol. 5, pp 522 - 542 (TREBST, A. & AVRON, M. eds.). - Berlin, Heidelberg.

151. SCHATZ, G. & MASON, T.L. (1974): The biosynthesis of mitochondrial proteins. - Annu. Rev. Biochem. 43: 51 - 87.

152. SCHATZ, G. (1979): How mitochondria import proteins from the cytoplasm. - FEBS Lett. 103: 201 - 211.

153. SCHMIDT, U.D. & PARADIES, H.H. (1977): The structure of the ε-subunit from the chloroplast coupling factor (CF_1) studied by means of small angle X-ray scattering and inelastic light scattering. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 78: 383 - 392.

154. SCHMIDT, U.D. & PARADIES, H.H. (1977): The structure of the δ-subunit from chloroplast coupling factor (CF_1) in solution. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 78: 1043 - 1052.

155. SCHNEIDER, E., MÜLLER, H.-W., RITTINGHAUS, K., THIELE, V., SCHWULERA, U. & DOSE, K. (1979): Properties of the F_0F_1 ATPase complex from Rhodospirillum rubrum chromatophores, solubilized by triton X-100. - Eur. J. Biochem. 97: 511 - 517.

156. SCHOPF, R., HEISE, K.P., SCHMIDT, B. & JACOBI, G. (1974): Reconstitution of photophosphorylation with thylakoid membranes treated with pyrophosphate. - Proc. third int. Congr. Photosynthesis, pp 911 - 919 (AVRON, M. ed.). - Elsevier, Amsterdam.

157. SCHOPF, R. (1977): The degree of CF_1 release and the reconstituting capacity of the depleted membranes. - Z. Naturf. 32c: 600 - 604.

158. SCHOPF, R. & HARNISCHFEGER, G. (1977): Studies on the retention of CF_1 with or without induced ATPase activity by pyrophosphate treated thylakoids and its relation to the regeneration of photophosphorylation. - Z. Naturf. 32c: 398 - 404.

159. SCHWARZENBACH, G. & ACKERMANN, H. (1948): Komplexone XII. Die Homologen der Äthylendiamintetraessigsäure und ihre Erdalkalikomplexe. - Helv. Chim. Acta 31: 1029 - 1048.

160. SCHWERZMANN, K. & PEDERSEN, P.L. (1981): Proton-adenosinetriphosphatase complex of rat liver mitochondria: Effect of energy state on its interaction with the adenosinetriphosphatase inhibitory peptide. - Biochemistry 20: 6305 - 6311.

161. SELMAN, B.R. & DURBIN, R.D. (1978): Evidence for a catalytic function of the coupling factor 1 protein reconstituted with chloroplast thylakoid membranes. - Biochim. Biophys. Acta 502: 29 - 37.

162. SENIOR, A.E. & BROOKS, J.C. (1971): The subunit composition of the mitochondrial oligomycin insensitive ATPase. - FEBS Lett. 17: 327 - 329.

163. SENIOR, A.E. (1973): The structure of mitochondrial ATPase . - Biochim. Biophys. Acta 301: 249 - 277.

164. SENIOR, A.E. (1979): The mitochondrial ATPase. - In: Membrane proteins in energy transduction, pp 233 - 278 (CAPALDI, R.A. ed.). - New York, Basel.

165. SERRANO, R., KANNER, B.I. & RACKER, E. (1976): Purification and properties of the proton-translocating adenosine triphosphatase complex of bovine heart mitochondria. - J. Biol. Chem. 251: 2453 - 2461.

166. SHAVIT, N. (1980): Energy transduction in chloroplasts: Structure and function of the ATPase complex. - Annu. Rev. Biochem. 49: 111 - 138.

167. SHOSHAN, V. & SHAVIT, N. (1973): On the reconstitution of photophosphorylation in chloroplast membranes. - Eur. J. Biochem. 37: 355 - 360.

168. SINGER, S.J. (1971): The molecular organization of biological membranes. - In: Structure and function of biological membranes, pp 145 - 222 (ROTHFIELD, L.J. ed.). - New York, London.

169. SINGER, S.J. & NICOLSON, G.L. (1972): The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. - Science 175: 720 - 731.

170. SMITH, J.B. & STERNWEIS, P.C. (1975): Restoration of coupling factor activity to Escherichia coli ATPase missing the delta subunit. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 62: 764 - 771.

171. SMITH, J.B. & STERNWEIS, P.C. (1977): Purification of membrane attachment and inhibitory subunits of the proton translocating adenosine triphosphatase from Escherichia coli. - Biochemistry 16: 306 - 311.

172. SMITH, J.B. & WILKOWSKI, C. (1978): A fragment of subunit γ remains tightly bound to the E. coli F_1-ATPase after trypsination. - Fed. Proc. 37: 1521.

173. SOLAINI, G. & BERTOLI, E. (1981): Lipid dynamics and lipid protein interaction in isolated beef heart mitochondrial ATPase complex. - FEBS Lett. 132: 127 - 128.

174. STERNWEIS, P.C. & SMITH, J.B. (1977): Characterization of the purified membrane attachment (δ) subunit of the proton translocating adenosine triphosphatase from Escherichia coli. - Biochemistry 16: 4020 - 4025.

175. STERNWEIS, P.C. (1978): The ε subunit of Escherichia coli coupling factor 1 is required for its binding to the cytoplasmic membrane. - J. Biol. Chem. 253: 3123 - 3128.

176. STERNWEIS, P.C. (1978): Thesis. - Cornell University, Ithaca N.Y. (zitiert nach BAIRD & HAMMES, 1979).

177. STERNWEIS, P.C. & SMITH, J.B. (1980): Characterization of the inhibitory (ε) subunit of the proton-translocating adenosine triphosphatase from Escherichia coli. - Biochemistry 19: 526 - 531.

178. STROTMANN, H., HESSE, H. & EDELMANN, K. (1973): Quantitative determination of coupling factor CF_1 of chloroplasts. - Biochim. Biophys. Acta 314: 202 - 210.

179. SUGINO, Y. & MIYOSHI, Y. (1964): The specific precipitation of orthophosphate and some biochemical applications. - J. Biol. Chem. 239: 2360 - 2364.

180. SÜSS, K.H. (1980): Identification of chloroplast thylakoid membrane polypeptides. - FEBS Lett. 112: 255 - 259.

181. TAKEDA, K., HIRANO, M., KANAZAWA, N., NUKIWA, N., KAGAWA, Y. & FUTAI, M. (1982): Hybrid ATPase's formed from subunits of coupling factor F_1's of Escherichia coli and thermophilic bacterium PS3. - J. Biochem. 91: 695 - 702.

182. TELFER, A., BARBER, J. & JAGENDORF, A.T. (1980): Electrostatic control of chloroplast coupling factor binding to thylakoid membranes as indicated by cation effects on electron transport and reconstitution of photophosphorylation. - Biochim. Biophys. Acta 591: 331 - 345.

183. TODD, R.D., GRIESENBECK, T.A. & DOUGLAS, M.G. (1980): The yeast mitochondrial adenosine triphosphatase complex. Subunit stoichiometry and physical characterization. - J. Biol. Chem. 255: 5461 - 5467.

184. TODD, R.D. & DOUGLAS, M.G. (1981): A model for the structure of the yeast mitochondrial adenosine triphosphatase complex. - J. Biol. Chem. 256: 6984 - 6989.

185. TODD, R.D. & DOUGLAS, M.G. (1981): Structure of the yeast mitochondrial adenosine triphosphatase. Results of trypsin degradation. - J. Biol. Chem. 256: 6990 - 6994.

186. TZAGOLOFF, A. (1970): Assembly of the mitochondrial membrane system. III. Function and synthesis of the oligomycin sensitivity-conferring protein of yeast mitochondria. - J. Biol. Chem. 245: 1545 - 1551.

187. TZAGOLOFF, A., RUBIN, M.R. & SIERRA, M.F. (1973): Biosynthesis of mitochondrial enzymes. - Biochim. Biophys. Acta 301: 71 - 104.

188. URIBE, E.G. (1972): The interaction of N,N'-dicyclohexylcarbodiimide with the energy conservation systems of the spinach chloroplast. - Biochemistry 11: 4228 - 4235.

189. VAMBUTAS, V.K. & RACKER, E. (1965): Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. I. Stimulation of photophosphorylation by a preparation of a latent, Ca^{++} dependent adenosine triphosphatase from chloroplasts. - J. Biol. Chem. 240: 2660 2667.

190. VAN DE STADT, R.J., KRAAIPOEL, R.J. & VAN DAM, K. (1972): $F_1 \cdot X$, a complex between F_1 and OSCP. - Biochim. Biophys. Acta 267: 25 - 36.

191. VOGEL, G. & STEINHART, R. (1976): ATPase of Escherichia coli: Purification, dissociation, and reconstitution of the active complex from the isolated subunits. - Biochemistry 15: 208 - 216.

192. WARREN, G.B., TOON, P.A., BIRDSALL, N.J.M., LEE, A.G. & METCALFE, J.C. (1974): Reconstitution of a calcium pump using defined membrane components. - Proc. natn. Acad. Sci. USA 71: 622 - 626.

193. WEEDEN, N.F. (1981): Genetic and biochemical implications of the endosymbiotic origin of the chloroplast. - J. Mol. Evol. 17: 133 - 139.

194. WEEKE, B. (1973): Rocket immunoelectrophoresis. - Scand. J. Immunol. 2 (Suppl. 1): 37 - 46.

195. WELLBURN, A.R. (1977): Distribution of chloroplast coupling factor (CF_1) particles on plastid membrane during development - Planta 135: 191 - 198.

196. WESTHOFF, P., NELSON, N., BÜNEMANN, H. & HERRMANN, R.G. (1981): Localization of genes for coupling factor subunits on the spinach plastid chromosome. - Curr. Gen. 4: 109 - 120.

197. WILD, A. (1980): Physiologie der Photosynthese Höherer Pflanzen. Die Anpassung an die Lichtbedingungen. - Ber. dt. bot. Ges. 92: 341 - 364.

198. WILSON, D.B. & SMITH, J.B. (1977): Bacterial transport proteins. - In: Bacterial transport, pp 495 - 557 (ROSEN, B.P. ed.). - New York, Basel.

199. WITT, H.T., SCHLODDER, E. & GRÄBER, P. (1976): Membrane-bound ATP-synthesis generated by an external electrical field. - FEBS Lett. 69: 272 - 276.

200. YOSHIDA, M., SONE, N., HIRATA, H. & KAGAWA, Y. (1975): A high stable adenosine triphosphatase from a thermophilic bacterium. - J. Biol. Chem. 250: 7910 - 7916.

201. YOSHIDA, M., OKAMOTO, H., SONE, N., HIRATA, H. & KAGAWA, Y. (1977): Reconstitution of thermostable ATPase

capable of energy coupling from its purified subunits. - Proc. natn. Acad. Sci. USA 74: 936 - 940.

202. YOSHIDA, M., SONE, N., HIRATA, H. & KAGAWA, Y. (1977): Reconstitution of adenosine triphosphatase of thermophilic bacterium from purified individual subunits. - J. Biol. Chem. 252: 3480 - 3485.

203. YOSHIDA, M., SONE, N., HIRATA, H., KAGAWA, Y. & UI, N. (1979): Subunit structure of adenosine triphosphatase. - J. Biol. Chem. 254: 9525 - 9533.

204. YOUNIS, H.M., WINGET, G.D. & RACKER, E. (1977): Requirement of the δ subunit of chloroplast coupling factor 1 for photophosphorylation. - J. Biol. Chem. 252: 1814 - 1818.

205. YOUNIS, H.M., MORJANA, N.A. & BAKRY, N.M. (1980): Low molecular weight chloroplast protein, a natural inhibitor of chloroplast coupling factor 1 adenosine triphosphatase. - In: First European Bioenergetics Conference, Short reports, p. 185 . - Patron-Editore, Bologna.

206. ZHESTKOVA, I.M. & MOLOTKOVSKII, Y.G. (1981): Isolation of homogeneous adenosine triphosphatase from chloroplasts using a fluorescence purity criterion and its properties. - Photosynthetica 15: 525 - 533.

207. ZWAAL, R.F.A., ROELOFSEN, B. & COLLEY, C.M. (1973): Localization of red cell membrane constituents. - Biochim. Biophys. Acta 300: 159 - 182.

Herrn Professor Dr. R.J. Berzborn danke ich für die Arbeitsmöglichkeit und den Freiraum, den er mir bei meinen Untersuchungen gewährte. Gleichzeitig danke ich ihm und auch Herrn Dipl. Biol. L. Klein-Hitpass für wertvolle Diskussionen. Zu den Proteinbestimmungen durch Elektroimmunodiffusion wurde ich von Herrn Prof. Berzborn angeregt.
Bei Frau R. Owura-Nhkruma und Herrn H. Winking bedanke ich mich für die Anfertigung zahlreicher Abbildungen und Fotos.

Lebenslauf

Geboren wurde ich am 31.12.1950 in Bochum als Sohn der Eheleute Hedwig und Johannes Roos. Nach der fünften Volksschulklasse besuchte ich ab 1962 den neusprachlichen Zweig des Graf-Engelbert-Gymnasiums in Bochum, an dem ich 1971 auch meine Reifeprüfung ablegte.
Nach dem Wehrdienst nahm ich zum Wintersemester 1973/74 das Studium der Biologie in Bochum auf. Mein besonderes Interesse galt hier der Zoologie und der Biochemie. Nach mündlicher Diplom-Haupt-Prüfung in Biologie und Abschluß meiner experimentellen Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen arbeitete ich seit Januar 1979 an der vorliegenden Dissertation.

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353